

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ЗА РАСТИТЕЛНО ПРОИЗВОДСТВО



**ЕФЕКТОТ НА РЕГУЛАТОРИТЕ НА РАСТОТ ВРЗ МИКРОПРОПАГАЦИЈАТА
НА НЕКОИ ДЕКОРАТИВНИ ВИДОВИ**

- МАГИСТЕРСКИ ТРУД –
Ивана Велешанова

Штип, Јуни 2019

Комисија за оцена и одбрана

Претседател:

Проф. д-р Фиданка Трајкова

Вонреден професор, Земјоделски факултет

Ментор

Проф. д-р Лилјана Колева Гудева

Редовен професор, Земјоделски факултет

Член:

Доц. д-р Даниела Димовска

Доцент на земјоделски факултет

Датум на одбрана: _____

Датум на промоција: _____

Не е доволен еден лист каде би можела да ја изразам целата моја благодарност која ја чувствувам кон сите Вас, кои бевте моја поддршка во изминатите години.

Бескрајна и огромна благодарност изразувам на мојот ментор, професор д-р Лилјана Колева Гудева, за сите стручни совети, за безрезервната поддршка, огромна помош, несебичност, безбројните совети со кои ми помогна во извршувањето на ова испитување. Навистина е чест и вистинско задоволство да се работи под нејзино менторство.

Искрена и длабока благодарност упатувам и кон проф. д-р Фиданка Трајкова, која со своите коментари и совети даде непроценлив придонес во изработката на овој труд, бидејќи без нејзина поддршка и огромна помош немаше да се оствари еден од најважните делови – статистичката обработка на резултатите потребна за пишување на магистерскиот труд.

Голема благодарност упатувам до доц. д-р Даниела Димовска кој со своите стручни коментари даде придонес за успешна изработка на овој магистерски труд.

Посебна благодарност изразувам и до лаборант дипл. инг. агроном Емилија Пенева чијашто стручна помош ми беше достапна во секој момент.

Должна сум да се заблагодарам и на целиот наставен кадар на Земјоделскиот факултет, кој директно или индиректно ми помогна во текот на истражувањето, како и до сите други лица и институции, кои овде не се спомнати, а кои на било каков начин учествуваа и дадоа придонес во реализација на овој магистерски труд.

И секако, неизмерна и најискрена благодарност му должам на моето семејство за покажаната толерантност, верба, разбирање и поддршка за време на изработката на магистерскиот труд.

Без сите горе споменати личности сето ова немаше ниту да започне и затоа може само да им кажам од сè срце на сите заедно:

ЕДНО ГОЛЕМО БЛАГОДАРАМ!

Рецензирани и објавени стручни, научни и апликативни трудови

Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Micropropagation of ornamental species *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given and *Ageratum* sp. sp. *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, XV (1/2). pp. 97-105. ISSN 2545-4455

Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Micropropagation of ornamental species *Petunia grandiflora* and *Dianthus chinensis* x *barbatus*. Yearbook, Faculty of Agriculture, Goce Delcev University -Stip, 14 (2016). 05-29. ISSN 1857-8608

Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Influence of different growth regulators on micropropagation of pink dianthus (*Dianthus chinensis* x *barbatus*). In: 3rd International Symposium for Agriculture and Food, 18-20 Oct 2017, Ohrid, Republic of Macedonia.

Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2018) Micropropagation of ornamental plants: practical application and opportunities in Republic of Macedonia. In: International Meeting Agriscience & Practice (ASP 2018), 10-11 May 2018, Stip, Macedonia.

Учество во научно-истражувачки проект

Koleva Gudeva, Liljana and Gulaboski, Rubin and Trajkova, Fidanka and Maksimova, Viktorija and Velesanova, Ivana (2017) Application of biotechnological methods for improvement of plant species. [Project]

Користени кратенки

ANOVA - Analysis of Variance

BA - N₆-бензиламинопурин

BAP - бензиламинопурин

B1 тиамин

B6 пиридоксин хидрохлорид

B5 Gamborg хранлив медиум

C₁₂H₂₂O₁₁- сахароза

(C₆H₁₀O₅)_n - скроб

C₂H₅OH - етанол

2,4 D - дихлорофеноксиоцетна киселина

ER- Eriksson хранлив медиум

GA₃- гиберелинска киселина

IAA - индол-3-оцетна киселина

IBA - индол-3-бутерна киселина

KIN - Кинетин, 6-фурфурил-аминопурин

MS - Murashige и Skoog хранлив медиум

NAA - 1-нафтил оцетна киселина

Хранлива подлога A (MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃)

Хранлива подлога B (MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA)

Хранлива подлога C (MS + 2 mg/l BA)

Хранлива подлога D (MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA)

Хранлива подлога E (MS + 5 mg/l BAP)

Хранлива подлога F (MS + 3 mg/l BA + 1,5 mg/l NAA)

Краток извадок

Основна цел на нашите испитувања беше да се постави култура од апикални пупки и котиледони на декоративните видови петунија *Petunia* sp., црвена декоративна зелка *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given, каранфил *Dianthus* sp. и агератум *Ageratum* sp., да се запознаат својствата на ткивата во *in vitro* услови и да се утврди нивниот потенцијал за органогенеза и регенерација во растение.

Апиклните пупки и котиледоните беа изолирани од семиња кои се изртени во асептички услови, а потоа беа култивирани на MS медиум (Murashige & Skoog, 1962) минерален раствор со 3% сахароза, 0,7% агар, а од фитохормоните беа користени IAA, BA, GA₃, NAA и BAP кои беа додавани во медиумот во различни комбинации и концентрации.

По 30 дена изданоци беа добиени само од апикални пупки, кај црвена декоративна зелка, каранфил и агератум, додека органогенезата кај петунија на MS медиум се одвиваше во формирање на калус и лисни розети. Вкоренувањето на изданоците беше стимулирано со ниски концентрации на ауксини MS + 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l IBA.

Културите беа држани во клима-комора на контролирани услови и тоа: релативна влажност од 80%, фотопериодизам 16/8 светло/мрак, 25°C температура и осветлување од 2000-3000 Lux. Добро вкоренетите растенија беа префрлени во пластични садови, наполнети со стерилна мешавина од песок, перлит и тресет (1:1:1), а нивната аклиматизација се одвиваше во три фази и тоа: најпрво во клима-комора, потоа во пластеници, и на крај регенерантите беа префрлувани во надворешни услови.

Клучни зборови: микропропагација, *in vitro*, изданоци, лисна розета, калус, вкоренување.

Abstract

The purpose of this work was to extend cultured tissues of decorative species *Petunia* sp., *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given, *Dianthus* sp. and *Ageratum* sp. from apical buds and cotyledones, to acquaint the tissue distinctively in *in vitro* conditions and their responsibility for organogenesis and regeneration in whole plants.

The apical buds and cotyledones were isolated from aseptically grown seedlings, then they were cultivated on MS medium (Murashige and Skoog 1962) mineral solution with 3% sucrose, 0.7% agar and hormones IAA, BA, GA₃, NAA, and BAP added in different combinations and concentrations.

After 30 days, leaflets were obtained only from apical buds, in red decorative cabbage, carnation and *Ageratum* sp., while the organogenesis at the petunia of the MS medium took place in the formation of callus and foliage rosettes. The rooting of the sputum was stimulated with low concentrations of auxins MS + 0.5mg/l IAA + 2.5 mg/l IBA.

All cultures were incubated in climate room conditions with relative humidity of 80%, photoperiod 16/8 light/dark, 25±1°C temperature and illumination of 2 000 – 3 000 Lux. The rooted plants were transferred into plastic pots, in a sterile mixture of peat, sand and perlite (1:1:1). The acclimatization went through 3 stages: first at climate room conditions; then at plastic room conditions and finally at outside climate conditions.

Key words: micropropagation, *in vitro*, sprays, leaf rosette, callus, rooting.

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	11
1.1.Производство на декоративни видови во светот и во Република Македонија	11
1.2.Таксономија, потекло и ботанички опис на испитуваните декоративни видови	13
1.2.1.Таксономија, потекло и ботанички опис на црвена декоративна зелка <i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given	13
1.2.2.Таксономија, потекло и ботанички опис на Петунија <i>Petunia</i> sp.	15
1.2.3.Таксономија, потекло и ботанички опис на Каранфил <i>Dianthus</i> sp.	17
1.2.4.Таксономија, потекло и ботанички опис на Агератум <i>Ageratum</i> sp.	20
1.3. Комерцијално производство на декоративни видови во <i>in vitro</i> услови	21
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	23
2.1. Микропропагација	23
2.2.Техники за размножување на растенијата во <i>in vitro</i> услови	24
2.2. Локација на меристемите	25
2.4.Фактори кои влијаат врз културата на растителните ткива	26
2.4.1. Избор на експлантат	26
2.4.2. Услови за одржување на културите	26
2.4.3. Површинска стерилизација	27
2.5.Состав, избор и подготовка на хранливата подлога (медиум)	27
2.5.1. Регулатори за раст на растенијата	31
2.5.2. Витамини	31
2.5.3. pH-вредност на медиумот	32
2.5.4. Извор на јаглерод	32
2.6.Типови на култури	32
2.7. Култура на апикални и аксиларни пупки	34
2.8.Фази на микроразмножување	35
2.8.1.Нулта фаза	36
2.8.2.Прва фаза - воведување во култура	36
2.8.3.Втора фаза – размножување или репродукција	37
2.8.4.Трета фаза – подготовка на културите за пренесување на културите во надворешни услови	38
2.8.5.Четврта фаза – пренесување на младите растенија во надворешни услови	39
2.9. Значењето на микропропагацијата	41
2.10.Сузбивање на вирусите	42
2.11.Предности на микропропагацијата	43
2.12. Недостатоци на микропропагацијата	43
2.13. Регенерација на адвентивни пупки и изданоци	45

2.14. Која растителна култура може комерцијално да се микропропагира?	46
2.15. Примена на технологијата на култура на ткиво во <i>in vitro</i> услови	47
2.16. Комерцијално микроразмножување	48
2.17. Досегашни истражувања за примена на <i>in vitro</i> техниките кај декоративните видови	49
2.17.1. Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given)	49
2.17.2. Петунија (<i>Petunia</i> sp.)	52
2.17.3. Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	54
2.17.4. Агератум (<i>Ageratum</i> sp.)	58
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	59
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	60
4.1. Стерилизација на семето	60
4.2. Стерелизација на хранлива подлога	60
4.3. Добивање на почетен материјал за микропропагација	62
4.4. Состав на MS подлогата за култивирање на експлантатите	63
4.5. Услови за одгледување на културите	64
4.6. Спектрофотометриско одредување на фотосинтетски пигменти	65
4.6.1. Постапка за екстракција	65
4.6.2. Постапка за квантитативно одредување на содржината на хлорофил и каротеноиди	67
4.7. Статистичка обработка на податоци	68
5. РЕЗУЛТАТИ	69
5.1. Култивирање на меристеми и котиледони и нивна регенерација по 30 и 60 дена	69
5.2. Култура на меристеми како почетни експлантати	70
5.2.1. Црвена декоративна зелка - <i>Brassica oleracea</i> (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given)	70
5.2.2. Петунија <i>Petunia</i> sp.	72
5.2.3. Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	75
5.2.4. Агератум (<i>Ageratum</i> sp.)	77
5.3. Култура на котиледони како почетни експлантанти	79
5.3.1. Црвена декоративна зелка - (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given)	79
5.3.2. Петунија (<i>Petunia</i> sp.)	80
5.3.3. Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	82
5.3.4. Агератум (<i>Ageratum</i> sp.)	83
5.4. Вкоренување и адаптација на изданоци	85
5.5. Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофил и каротеноиди) на декоративните видови во <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> услови	88
5.5.1. Хлорофил а	88

5.5.2 Хлорофил b.....	91
5.5.3. Вкупни хлорофили a+b	95
5.5.4. Каротеноиди	98
6. ДИСКУСИЈА	102
6.1.Култивирање на меристеми и котиледони и нивна регенерација по 30 и 60 дена	102
6.2.Култура на меристеми како почетни експлантати	102
6.2.1. Црвена декоративна зелка - (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given)	102
6.2.2. Петунија (<i>Petunia</i> sp.)	104
6.2.3. Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	105
6.2.4. Агератум (<i>Ageratum</i> sp.).....	107
6.3. Култура на котиледони како почетни експлантанти	107
6.3.1.Црвена декоративна зелка - (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given).....	108
6.3.2. Петунија (<i>Petunia</i> sp.)	108
6.3.3. Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	108
6.3.4. Агератум (<i>Ageratum</i> sp.).....	109
6.4.Вкоренување и адаптација на изданоци.....	109
6.5.Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофили и каротеноиди) на декоративните видови во <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> услови.....	110
6.5.1.Хлорофил а.....	110
6.5.2 Хлорофил b.....	112
6.5.3. Вкупни хлорофили a+b	113
6.5.4. Каротеноиди	115
6.6. Соодносот на фотосинтетските пигменти	116
7. ЗАКЛУЧОК	119
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	122

1. ВОВЕД

1.1. Производство на декоративни видови во светот и во Република Македонија

Од најстарите времиња на човековата цивилизација декоративните растителни видови биле одгледувани за лекување, зачини, користени во различни обичаи и ритуали, а дури потоа се користеле како декоративни видови. Цвеќето било привилегија за богатите луѓе, на пример во Индија се сметало за кривично дело ако обичен човек посади орхидеја. Денес секој може да одгледува и чува цвеќиња во своите дворови, градини и домови. Висечките градини на Стариот Вавилон се сметаат за седмо чудо на стариот век. Во Персија се одгледувале лалиња, нарциси, ружи и други видови на цвеќиња. Римјаните вештината за одгледување на цвеќе ја добиле од Египет и Персија, а понатаму толку ја развиле што производството на цвеќе ги потиснало сите останати земјоделски производи.

Најголемиот производител на цвеќе е Холандија, која произведува 10 милијарди луковици од различни цветни видови на годишно ниво, а тоа е всушност 70% од светскиот цветен пазар (Атанасовка, 1995).

Аналогно на производството на цвеќе во светот, истражувања за домашното производство, како и анализа на декоративните видови, се изведува и кај нас. Во Република Македонија производството на цвеќе е доста раширено, особено во југоисточниот дел (струмичкиот и гевгелискиот регион) каде условите за производство на декоративни видови се доста поволни и овозможуваат производство на квалитетно цвеќе, кое може да биде доста конкурентно на светските пазари во однос на својот квалитет и цена. Во Република Македонија претежно се произведува режано цвеќе (каранфил, хризантема, кала, гладиола, гербер и други видови) кое се смета и за најпродавано цвеќе. Истото цвеќе може да се најде како производ на цветните пазари, цвеќари и градинарски центри кои се сметаат како главни пазари за трговија со цвеќе (Атанасовка, 1995).



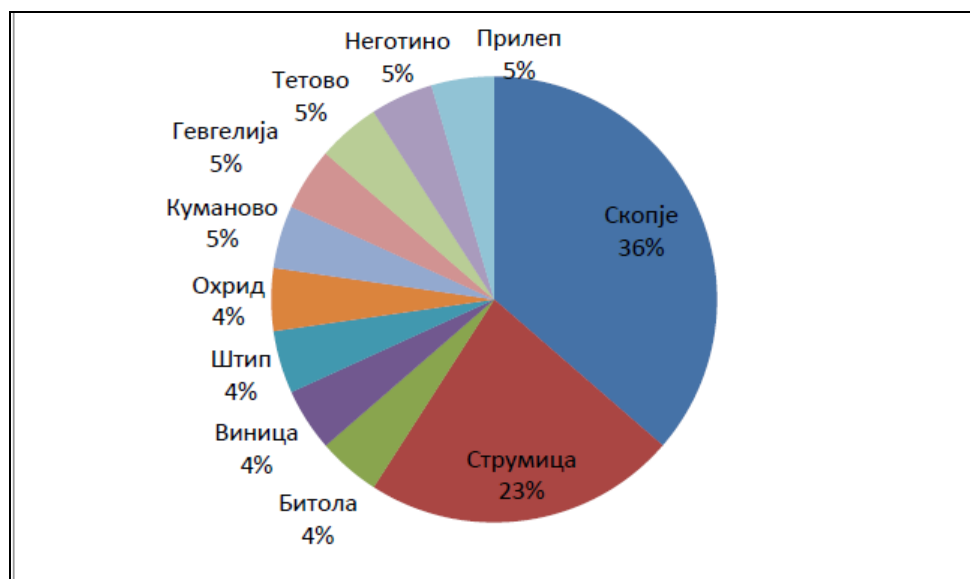
Слика 1. а) Берза на цвеќе во Холандија, б) најголем производител на цвеќе во светот е Холандија (Атанасовка, 1995)

Figure 1. a) Flower Flower in the Netherlands, б) The largest flower producer in the world is the Netherlands (Atanasovka, 1995)

Табела 1. Некои производители на цвеќе во Република Македонија (Централен регистар на Р Македонија, 2007)

Table 1. Some flower producers in the Republic of Macedonia (Central Registry of the Republic of Macedonia, 2007)

Име на производител (Producers name)	Адреса (Address)
Градинар	Борис Трајковски 7 б.б. (Првوماјска), Скопје
Еко Раст-градинарски центар	Борис Трајковски б.б. (Првوماјска), Скопје
Флораком 1	Франклин Рузвелт 8, Скопје
ИЗ Китка	Јустинијан I, 109 (Драчевска), Скопје
Марија	бул.К.Ј.Питу 15 лок.7, Скопје
Прогарден БК	Маџари 28-2/15, Скопје
Карпко	Петар Чајковски 54-а, Скопје
Еко Трим	Саса 2/18, Скопје
Агро-Атанас	с.Бориево 166, Струмица
Хорти-експерт Мицевски	с.Банско 12-а, Струмица
Ристов Илчо	с.Владевци 93-а, Струмица
с.Владевци 93-а	с.Владевци 93-а, Струмица
Градина цвет	с.Владевци 124, Струмица
Расадник Христовски	с.Могила, Битола
СБВ Ромеро Витро	Илинденска б.б., Веница
Кимак	Чардаклија 60, Штип
Протеа	Караорман 38, Прилеп
Мартина	Македонски Просветители 13, Охрид
Бо-бо	Благоја Тоска 49/1, Тетово
Расадник	с.Доброшане, Куманово
Сантини	Миле Пецанов 30, Гевгелија
Прогрес Агрофармација	Илинденска б.б., Неготино



Слика 2. Распределеност на производителите на цвеќе во Република Македонија (Централен регистар на Македонија)
 Figure 2. Distribution of flower producers in the Republic of Macedonia (Central Registry of Macedonia)

1.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на испитуваните декоративни видови

1.2.1. Таксономија, потекло и ботанички опис на црвена декоративна зелка *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given

Таксономска припадност на црвената декоративна зелка (*Brassica oleracea* cv. Kyoto red given) според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е следната:

Царство – Plantae

Оддел–Tracheophyta

Класа- Magnoliopsida

Подкласа-Dilleniidae

Ред- Brassicales

Фамилија- Brassicaceae

Род- *Brassica*

Вид–*Brassica oleracea* L.

Орнаменталните сорти потекнуваат од Јапонија. На крајот од есента кога има најмалку цветни растенија во градините, тогаш декоративната зелка ги краси дворовите во најразлични бои. Украсната зелка не е многу висока и е нежна, па затоа не се препорачува да се чува како висечка.

Многу сорти се со светли бои, главно со зелена боја на надворешните лисја и бела или црвено-виолетова боја во центарот. Постојат и други комбинации на бои, рабовите на листовите се светло обоени, а средината на листот ја задржува својата зелена боја. Листовите можат да бидат цели и рамни, растенијата формираат прекрасна лисна розета. Особеноста на декоративните сорти на зелка е дека најинтензивната боја на растението се стекнува на температура под +10°C.

Листовите се последователни (ретко наспрамни), понекогаш организирани во базални розети. Тие се многу често перести по изглед и немаат прилисниц.

Стеблото е лиснато, листовите се голи со зелена боја. Листовите формираат розета, збиени еден кон друг формираат глава околу стеблото. Долните лисја се многу поголеми тие се месести тесно распоредени со истакнати жили.

Градбата на цветовите е многу униформна во целата фамилија *Brassicaceae*. Тие имаат четири слободни венечни ливчиња и четири канцести чашкини ливчиња. Може да се дисиметрични или малку зигоморфни, со крстовидно подредување. Присутни се шест прашници, од кои четири се подолги и се наредени крстовидно следејќи го венчето, додека другите се пократки (тетрадинамичен цвет).

Плодникот е составен од два споени плодни листови, а устенцето е многу кратко, со два лобуса. Плодникот е натцветен. Цветовите образуваат соцветија.



Слика 3. Црвена декоративна зелка во *in vivo* услови (Velesanova et al., 2017)
 Figure 3. Red decorative cabbage in *in vivo* conditions (Velesanova et al., 2017)

1.2.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на Петунија *Petunia* sp.

Таксономска припадност на петунијата (*Petunia* sp.) според ICBN е следната:

Царство – Plantae

Оддел – Tracheophyta

Класа – Magnoliopsida

Подкласа – Asteridae

Ред – Solanales

Фамилија – Solanaceae

Род – Petunioideae

Вид – *Petunia* sp.

Петунијата (*Petunia* sp.) е сезонско цветно растение и е најраспространето летно цвеќе, посебно на балконите како саксиско цвеќе. Популарно цвеќе е поради цветовите кои се звонолики едноставни и полни и се со карактеристичен мирис, постојат големи и мали цветови скоро во сите бои

од различни тонови. Кај нас се одгледува како едногодишно растение. Потребна е висока влажност на воздухот додека не се појават првите 'ртулци, а потоа е потребно да се намалува температурата. Петунијата може да страда доколку се наоѓа на место каде нема доволно светлина и топлина во текот на денот. Ја напаѓаат штетници и затоа бара редовна заштита од болести и штетници.

Петуните цветаат во јули и продолжуваат со светли бои до првите мразови. Големото двојно или едноставно цвеќе може да биде монофонично или со граница.

Петунијата е економски важен растителен вид (Mol et al., 1985; Quattrocchio et al., 1998). Таа е многу разновидна и е достапна во голем број на бои (Christopher, 1994). Декоративни растенија се произведуваат исклучиво за нивните естетски вредности.

Името доаѓа од индискиот збор „петун“, кој во дијалектот на Јужноамериканските Индијанци е име за тутун и ни кажува за блиската врска меѓу тутунот и петуниите. И двата рода му припаѓаат на семејството Solanaceae, и сè уште е вообичаена за нив да имаат наркотични ефекти. Родот *Petunia* вклучува околу 40 видови на едногодишни, двегодишни и трајни тревни растенија од жешките региони на Јужна Америка и се одгледуваат во наше годишно сезонско цвеќе.

Петуниите имаат тревесто и разгрането стебло со висина до 60 cm. Лисјата се јајцевидни, единечни и приседнати. Растенијата се прекриени со лепливи влакненца. Цветовите се крупни, единечни, трубичести и мирисни. Распоредени се на кратки дршки. Цветањето е од мај до доцна есен (Хаџи Пецова, 2017).



Слика 4. Петунија (<https://nekretninebl.com/cvijece-koje-cvjeta-cijelo-ljeto-petunija/>), преземено 29.9.2018

Figure 4. *Petunia* (<https://nekretninebl.com/cvijece-koje-cvjeta-cijelo-ljeto-petunija/>), retrieved on 29.9.2018

1.2.3.Таксономија, потекло и ботанички опис на Каранфил *Dianthus* sp.

Таксономска припадност на каранфил *Dianthus* sp. според ICBN е:

Царство – Plantae

Оддел–Tracheophyta

Класа-Magnoliopsida

Подкласа-Caryophyllidae

Ред- Caryophyllales

Фамилија- Caryophyllaceae

Род- *Dianthus*

Вид–*Dianthus* L.

Каранфилот (*Dianthus* sp.) е зелено цветно растение, научното име каранфил го добил поради убавината на своите цветови и значи Бог, па тој

назив може и да се преведе и како божествен цвет. Постојат околу 300 варијатети на каранфил со своите плишани цветови во розе, бела и црвена боја, но ги има и со шарени цветови. Испитуваниот каранфил е хибрид на 2 видови од родот *Dianthus* и тоа помеѓу *Dianthus chinensis* L. x *Dianthus barbatus* L. (народно познат како топ каранфил). Каранфилот може да биде едногодишно и повеќегодишно растение. Каранфилот што се одгледува кај нас слабо поднесува ниски температури и бара светли места, не поднесуваат голема влага. Листовите на каранфилот се иглести и густы кои го красат просторот дури и кога нема цветови. Треба редовно да се наводнува, но со мала количина на вода. Најчесто го напаѓаат штетници како што се лисни вошки, црвен пајак и неметоди.

Каранфилите спаѓаат во родот *Dianthus* имаат привлечни, честопати миризливи цветови и сивозелени вечно-зелени листови. Класифицирани се во групи според начинот на растење, карактеристиките на цветовите и отпорноста на студ. Модерните каранфили позачестено цветаат и имаат посилен раст од традиционалните сорти. Каранфилите за леи во текот на три до четири години сè пообилно раѓаат цветови. Каранфилите со повеќекратно и разгрането цветање се со многу повисок раст отколку оние за леи, не се отпорни на студ, а може да цветаат речиси преку целата година. Традиционалните каранфили Малмаисон, имаат големи, двојни и особено миризливи цветови, се одгледуваат во студена стаклена градина (Ѓорѓиевски, 2012).

Каранфил е заедничко или национално име за различните родови на кои *Dianthus* припаѓаат на семејството на Caryophyllaceae и Caryophyllales. Родот *Dianthus* е прилагоден на постудени, планински региони на Европа и Азија, но исто така се наоѓаат во медитеранските крајбрежни области. Родот *Dianthus* содржи неколку видови кои се одгледуваат за декорација веќе стотици години. Каранфил се одгледува во средниот век за производство на парфеми, но тие исто така се користат како декоративни растенија во градините и во индустријата за сечење цвеќе. Нови сорти на каранфил за сечено цвеќе се избрани според големината на цвеќето, бројот на ливчиња, должината на стеблото и отпорноста на болести. Во 19 век, комерцијалното одгледување беше проширено во Франција, вклучително и одгледување на отворено и одгледување на стакленици.



Слика 5. Каранфил (фотографија Велешанова, 2016)
Figure 5. *Dianthus* spp (photo Velesanova, 2016)

Dianthus chinensis како и *Dianthus barbatus* се одгледуваат како самостојно или полуосетливо едногодишно растение. Сите каранфили се познати како долготрајно режано цвеќе.



Слика 6. а) *Dianthus barbatus*, б) *Dianthus chinensis* (фотографија Велешанова 2016), испитуваниот каранфил е хибрид помеѓу а и б видовите
Figure 6. а) *Dianthus barbatus*, б) *Dianthus chinensis* (photo Velesanova, 2016), the examined carnation is a hybrid between a and b species

Стеблото на каранфилот е исправено, покриени со сиво-син налеп. Разгранувањата на врвот имаат еден или повеќе цветови. Кореновиот систем е слабо развиен. Лисјата се линеарни, мазни приседнати и се поставени еден наспроти друг. Цветовите можат да бидат прости и сложени. Формата на венечните ливчиња е триаголна, обратно јајцевидна, назабена и изрецкана. Чашката е цилиндрична. Кај простите форми има 5 венечни ливчиња, а кај сложените цветови околу 50 венечни ливчиња. Цветовите се најразлично обоени, бели, црвени, пурпурни, жолти или во нежна боја на праска со различни комбинации, со чисти бои или прошарани (Хаџи Пецова, 2017).

1.2.4.Таксономија, потекло и ботанички опис на Агератум *Ageratum* sp.

Таксономска припадност на агератум *Ageratum* sp. според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е следната:

Царство – Plantae

Оддел–Tracheophyta

Класа-Asterales

Подкласа-Asteridae

Ред- Asterales

Фамилија- Asteraceae

Род- *Ageratum* sp.

Вид–*Ageratum* sp.

Името на родот потекнува од грчкиот збор *ageratos* што значи „секогаш млад“, а се однесува на должината на цветањето. Цветовите на овој вид се во нијанси на сина, но можат да бидат розова, лаванда или бела боја. Агератумот е еден од ретките кој е со вистински сини цветови.

Агератумот се нарекува сина ѕвезда (слика 7 а и б). Тоа е едногодишно растение со лесни срдечни срца, лесно покриени со влакна и бледо мали цветови кои можат да бидат бели, сини, розови, виолетови и др. Цвета од мај до октомври. Расте до 30 сантиметри, но исто така има и варијанти кои растат до 50 сантиметри во свилени жолти или сино-зелени сорти со долги, сјајни глави. Агератумите бараат сонце и треба да бидат засадени на растојание помало од 15 cm за подобар развој. Тие се засадуваат со семе на температура за пораст од 13°C.

Агератумот е декоративен вид кој цвета од доцната пролет па сè до појавата на првите мразови. Агератумот бара влажна добро исцедена почва, но не поднесува суви услови. Агератумот е вид кој е отпорен на инсекти или болести, иако понекогаш пајакот (*Davallia*) може да влијае на растенијата, особено во топло, суво време (Ѓорѓиевски, 2012).



Слика 7. а) Агератум б) цвет од агератум (фотографија Велешанова, 2016)
 Figure 7. a) *Ageratum* sp. b) *Ageratum* sp.flower (photo Velesanova, 2016)

Растението има разгрането и компактно стебло. Лисјата се влакнести, а според формата се срцевидни. Цветот е ситен, тесно трубичест, сместен во соцветие главица. Бојата на цветот најчесто е со сини нијанси, но има и розови и бели цветови. Цветањето трае долго, до настапувањето на студовите. Има бројни сорти ниски до 15 cm, средно високи 30 cm, кои се накценети и високи до 60 cm. Сортите се групирани и според намената, сорти за цветни леи и сорти за режан цвет (Хаџи Пецова, 2017).

1.3. Комерцијално производство на декоративни видови во *in vitro* услови

Комерцијалното производство на декоративните растенија постојано расте на светско ниво и неговото финансиско значење постојано се зголемува. Околу 156 декоративни видови се произведуваат преку култура на ткиво во различни комерцијални лаборатории низ целиот свет. *In vitro* култура на растенија е една од клучните алатки во растителната биотехнологија која се заснова на способноста за тотипотнетност на растителните клетки. Генерално, култура на ткиво се однесува и на култура на клетка, ткиво и органи во *in vitro* услови и може да се користи за масовно производство на безвирусни клонови и конзервација на генетските ресурси. Индустијата за декоративни растенија ги користи *in vitro* методите за пропација за масовно производство на елитни супериорни генотипови на декоративни растенија (Rout, et al., 2006).

Декоративните растенија се произведуваат исклучиво за нивните естетски вредности. Понатамошниот раст и успех зависи од развојот на нови технологии, како што е културата на ткива (Geneve et al., 1997). Подобрувањето на растителниот квалитет како што се бојата на цветните ливчиња, долговечноста на цветот, обликот на растенијата и создавањето на нови хибриди се важни економски цели во комерцијалното производство на декоративните видови во *in vitro* услови (Burchi et al., 1995).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Микропропагацијата преку култура на меристеми денес е широко експлоатиран метод на *in vitro* култивирање на растителните видови. Културата на меристемска пупка има многу голема примена во комерцијалното производство на различни растителни видови кои имаат економско значење. Тоа е моќна алатка за производство на многу хортикултурни видови, вклучително и декоративни растенија.

Денес голем број на тропски, суптропски, дрвенести и тревести видови се размножуваат во *in vitro* услови. Имено, во *in vitro* услови можно е да се клонираат и тие видови кои досега со примена на класичните методи немале можност или воопшто вегетативно не се размножувале. Важно е да се истакне дека од досегашните техники за култура на растително ткиво и клетки, клонирањето на растенијата постигнало најширока примена. Но, покрај предности микроразмножувањето има и свои недостатоци.

2.1. Микропропагација

Размножувањето во *in vitro* услови е многу побрзо во споредба со истиот со класичните и конвенционални методи на вегетативно размножување. Во култура *in vitro* се размножуваат само здрави растенија, а тоа најверојатно е резултат на строгата селекција, или пак растенијата оздравуваат во културите во *in vitro* услови. Овој процес се нарекува јувенилизација или подмладување на ткивото, органот или изданокот кој се култивира на хранлива подлога за микропропагација. Вегетативното размножување на културите *in vitro* бара многу мал почетен материјал, кој е одбран материјал. Благодарение на можноста за одбирање постои можност брзо да се постави полски опит потребен за понатамошна селекција. Исто така, со *in vitro* размножување може да се заштедат доста средства кои инаку се трошат за изградба на стакленици и друг простор. Воедно се намалува и просторот кој се користи за подигање на матичњаци. Благодарение на оптималните услови (хранливата подлога и физичките фактори) се овозможува прецизно временско планирање на

производство на садници, а со тоа се избегнува сезонското влијание и се постигнува производство и во текот на цела година. Размножувањето *in vitro* овозможува оживување на резниците и со тоа се избегнува калемењето. Тоа е од посебна важност за видовите на ружа, јоргован и рододендрон.

Еден од поважните фактори е растителниот материјал. При микропропагација *in vitro* честопати се користи врвен меристем со лисни примордии или пак одредени растителни органи (врв од изданок или сегмент од нодија). Анатомските карактеристики на апикалниот меристем се познати и се знае дека централната зона е мала и е со овален облик, а иницијацијата на органите се наоѓа во приферната зона. Како второ, важна е големината и типот на изолираниот експлантат.

Кај растенијата постојат два типа на меристемски експлантат:

- апикален меристем недиференцирано ткиво, лоцирано во внатрешноста од апикалната пупка на изданокот;
- апикална пупка на изданокот – структура која се состои од апикален меристем на изданокот и која содржи од една до неколку лисни примордии.

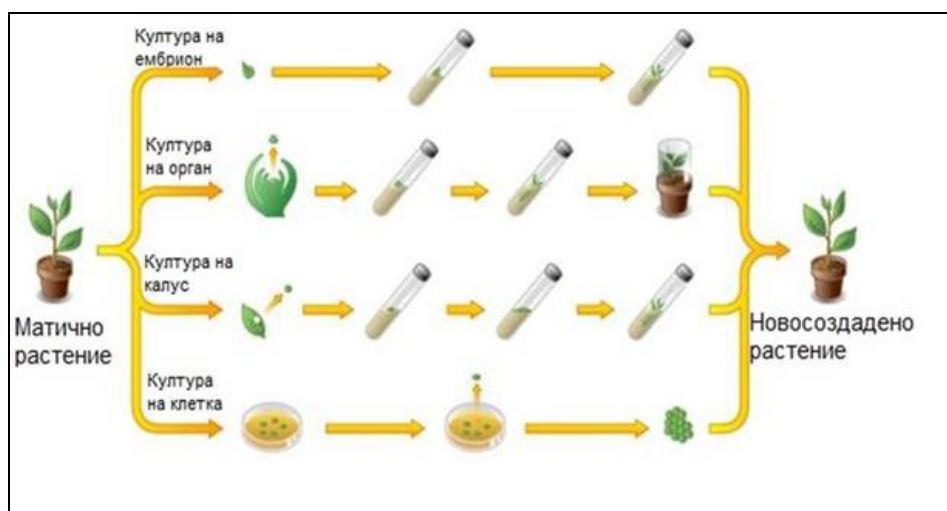
2.2. Техники за размножување на растенијата во *in vitro* услови

Техниките за размножување на растенијата во *in vitro* услови според авторот Pierik (1987) се следните:

- култура на непроменети растенија (семе *in vitro*);
- култура на ембриони (изолирана од семе);
- култура на органи (пупки, корен, изданоци, антери итн.);
- култура на калуси (најчесто се должи на диференцијацијата на ткивото);
- култура на поединечни клетки (одгледување на индивидуални клетки добиени од калусот или од диференцирано ткиво);

- култура на протопласти (добиена со изолација и отстранување на клеточниот сид од растителните клетки).

Некои од техниките за размножување на растенијата во *in vitro* култури на ембрион, орган, калус и клетка шематски се претставени на слика 8.



Слика 8. Создавање на ново растение во услови *in vitro*, (http://agritech.tnau.ac.in/bio-tech/biotech_tc_notes.html), преземено на 24.8.2018
Figure 8. Creating a new plant in *in vitro* conditions (http://agritech.tnau.ac.in/bio-tech/biotech_tc_notes.html), retrieved on 24.8.2018

2.2. Локација на меристемите

Кај растенијата меристемите кои се локализирани во врвните (апикални) и страничните (аксиларни) пупки. Експлантатите земени од врвот на изданокот се во помлад развоен стадиум, во споредба со тие од базалниот дел. За регенерација на изданоците оптимален е младиот развоен стадиум на експлантатот. Кај каранфил развојот на врвните експлантати во изданок е 88,6%, додека кај тие земени од базалниот дел развојот во изданок е 69,8%. Исто така, и кај хризантемата поглем успех бил добиен кај експлантатите земени од терминалните пупки. Тоа значи дека терминалните пупки имаат поголем потенцијал во споредба со латералните. Многу автори (Murashige, 1979; Boxus & Druat, 1980; Debergh, 1991; Seskinger, 1991; Redenbang, 1991) за клонска микропропагација препорачуваат користење исклучиво на апикални меристеми, не само заради погодноста на ткивото за брза регенерација туку и заради генетската стабилност на добиените регенеранти.

2.4.Фактори кои влијаат врз културата на растителните ткива

Постојат неколку фактори кои влијаат врз растителните ткива и тоа избор на експлантат, услови за одржување на културите и површинска стерилизација.

2.4.1. Избор на експлантат

Ткивото кое се изолира од растението и се поставува во култура се нарекува експлант, (Idowu et al., 2009). Изборот на експлантатите кои треба да се изолираат зависи од:

- вид на култура што треба да се започне;
- целта на предложената култура;
- растителни видови што ќе се користат.

2.4.2. Услови за одржување на културите

Физичките барања, како што се температурата, интензитетот на светлината, фотопериодот и релативната влажност, можат да влијаат на процесот на *in vitro* диференцијацијата од различни експлантати, вклучувајќи ги и меристемите (Vasil & Throp, 1994; Khachatourians et al., 2002). Одговорот на културата може да влијае врз времетраењето на изложеноста на светлина и неговиот интензитет и квалитет, (Khachatourians et al., 2002). Високата влажност во просторијата за култура треба да се избегнува, затоа што ја зголемува контаминацијата (Smith, 2013).

2.4.3. Површинска стерилизација

Првиот услов за успех на една култура е обезбедување на асептични или стерилни услови. Одржувањето на стерилни услови (ослободен од надворешно присуство на сите микроорганизми) е од суштинско значење за успешните процедури за култура на ткива. За да се одржи асептична средина, сите садови, медиуми и инструменти кои се користат за ракување со ткивата, како и самиот експлант, мора да се стерилизираат. Важно е да се задржи воздухот, површината и подот без прашина. Сите операции треба да се изведуваат во ламинарен стерилен кабинет.

Стерилизацијата е процес на експлоатација на контаминација пред да се воспостави култура. За деконтаминација на ткивата се користат разни агенси за стерилизација. Овие агенси се исто така токсични за растителните ткива, па треба соодветната концентрација на агенси, времетраењето на изложување на експлантот на разните агенси, секвенците на користење на овие агенси треба да се стандардизираат за да се минимизира експлозивната повреда и да се постигне подобро преживување (Badoni & Chauhan, 2010).

Дезинфициенси обично се користат како натриум хипохлорит, калциум хипохлорит, етанол, меркурен хлорид, водород пероксид и сребро нитрат. Повеќето лаборатории користат натриум или калциум хипохлорит или разни комерцијални белези за површинска стерилизација на експлантанти. Бидејќи овие стерилизирани агенси се токсични за растителното ткиво, контаминацијата мора да се отстрани без убивање на растителни клетки, (Mihaljević et al., 2013). Изборот на третман обично се определува од природата на експлантот и степенот на надворешната контаминација (Hall, 1999).

2.5. Состав, избор и подготовка на хранливата подлога (медиум)

Во почетокот на развојот на техниката култура на растителни ткива, често се употребувал составот на подлогата по White (1963). Составот на

медиумот е одлучувачки за растот на културите. Оваа подлога содржи хранливи состојки кои им се потребни на растителните клетки и оваа подлога се употребува и денес, посебно за култура на изолирани коренчиња (Jelaska, 1994).

Растителниот експлантант расте и се развива во услови *in vitro* на вештачки хранливи подлоги или медиуми. Успешниот развој на култивираниите клетки, ткива или органи ќе зависи од изборот на составот на хранливата подлога. Со додавање на потребните компоненти во соодветниот облик и комбинација, се овозможува создавање на култура, речиси од секој дел на растението, почнувајќи од филогенетски нижите растенија, како што се мововите, па сè до тревестите и дрвенестите видови. Тоа овозможува културите на ткива да се применуваат како техника за постигнување на различни цели.

Без оглед на разликите меѓу хранливите подлоги кои денес се употребуваат, сите тие содржат минерални соли, јаглехидрати како извор на енергија (најчесто сахароза), витамини и регулатори на растот во својот состав. Подлогата мора да ги содржи соодветните количини и односи на неорганските состојки, кои ќе ги задоволат прехранбените и физиолошките потреби на клетките во културата. Ако тоа се постигне, клетките нема да бараат дополнително органски додатоци како што се аминокиселини, екстракти од квасец, хидрозилат казеин или кокосово млеко (Jelaska, 1994).

Најупотребувана хранлива подлога е онаа на Murashige & Skoog, (1962), која се применува за голем број на култури. Оваа подлога се разликува од многу други подлоги по високата содржина на калиум, нитрати и амониумови јони. Во многу случаи потребите за некои од хранливите состојки се исполнувале лесно со покачување на концентрацијата на неорганските соли, посебно на азотните соединенија, но и на шеќерите и витамините (Jelaska, 1994).

Кога во литература се цитира одредена подлога, како на пример, подлогата MS, тоа подразбира дека составот на минералните соли е идентичен на подлогата MS (Murashige и Skoog, 1962), а другите додатоци како што се витамини, хормони и друго можат да отстапуваат и да се разликуваат од

оригиналниот состав, наведени во публикацијата на Murashige и Skoog (1962), бидејќи се прилагодуваат на потребите на одредени растителни видови како и за намерите за кои се поставува наведената култура. Хранливите подлоги MS и ER (Eriksson, 1965) се многу слични, но ER содржи двојно поголема количина на фосфат и значајно помала концентрација на микроелементите од MS, кои можат да бидат погодни за некои типови клетки и растителни видови. Тестирани се многу основни хранливи подлоги (мешавина од неоргански соли) и во резултатите се покажало дека повеќето подлоги ги задоволуваат потребите на различни култури на растителни клетки.

Подлогата B5 (Gamborg, 1968) е испитувана на голем број калусни култури и култура на клетки. Некои видови на калусните култури и култура на клетки подобро растат на подлогата MS, а некои други на B5 и ER. Подлогата B5 содржи релативно мали количини на амониумови јони, кои во некои случаи можат да го стопираат растот на клетките.

Во составот на секоја хранлива подлога ги има следните компоненти:

- Јаглехидрати,
- Органски додатоци,
- Неоргански соли,
- Регулатори на раст,
- Витамини.

Јаглехидратите служат во подлогата како извор на енергија. Сахарозата како најпогодна за повеќето клетки се користи во концентрација од 2-4 %. Може да биде заменета и со гликоза или фруктоза, додека другите шеќери се слаб извор на јаглерод (Jelaska, 1994).

Од различните витамините кои се додаваат во хранливата подлога и кои се употребуваат во посебни случаи, се мисли дека само B1 односно тиаминот (во облик на хидрохлорид), навистина е потребен за растителните клетки, бидејќи тие не можат да го синтетизираат во потребните количини.

Никотинската киселина и В6 пиридоксин (во облик на хидрохлорид) исто така, можат поволно да делуваат на растот (Jelaska,1994).

Неорганските соли се повеќето минерални соли кои ја задоволуваат потребата на културата за макроелементи и микроелементи. Подлогата мора да содржи најмалку 25 mmol азот и 25 mmol калиум. Количина од 1-3 mmol калциум, сулфат и магнезиум во повеќето случаи е задоволителна.

Од составот на регулаторите на растот во подлогата, ќе зависи понатамошната органогенеза, развој и намена на културата. Создавањето на калус во повеќето случаи се постигнува со додавање на 2,4-D (10⁻⁶ до 10⁻⁸ mol). Дополнително со 2,4-D и цитокинини (кинетин, зеатин или бензиламинопуриин во концентрација 10⁻⁶ до 10⁻⁷ mol) може добро да делува на калусогенезата, но само 2,4-D е доволен во многу случаи (Jelaska,1994).

Ауксини и цитокинини кои најчесто се додаваат во подлогата се прикажани во Табела 2.

Табела 2. Ауксини и цитокинини кои најчесто се додаваат во подлогата (Колева-Гудева, 2010)

Table 2. Growth regulators which are commonly added to the substrate (Колева-Гудева, 2010)

Ауксини / Auxins	Цитокинини / Cytokonins
3-индолоцетна киселина (IAA) / 3-indoleacetic acid (IAA)	N6-бензиламинопуриин (BA) / N6-benzylaminopurine (BA)
3-индолбутерна киселина (IBA) / 3-indolebutyric acid (IBA)	N6-у,у- диметилалиламинопуриин (2iP) / N6-у,у- dimethylallylaminopurine (2iP)
1-нафталиноцетна киселина (NAA) / 1-naphthalene acetic acid (NAA)	N6-фурфуриламинопуриин или кинетин (KIN) / N6- furfurylaminopurine or kinetin
4-хлорофеноксиоцетна киселина (CPA)/4-chlorophenoxyacetic acid (CPA)	
2,4-дихлорофеноксиоцетна киселина (2,4-D) / 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D)	

Ако културата се поставува заради морфогенеза, тогаш комбинацијата од ауксин (NAA) и цитокинин (BA, зеатин или изо-пентиладенин) ќе биде многуподобра од комбинацијата со 2,4-D. Додека 2,4-D ја поттикнува клеточната делба, комбинацијата од ауксин NAA, IBA или IAA со цитокинин

(KIN или BAP) е поповолна за поттикнување на морфогенезата, која пак 2,4-D ја попречува. NAA може да биде заменета со IAA, но IAA треба да се стерилизира со филтрација. Самата IAA понекогаш може да биде разградена од ензимите на ткивата кои се култивираат, па во овој поглед е помалку стабилна од синтетичките ауксини, како што се NAA, IBA или 2,4-D. За индукција на калусните ткива посебно е ефективна 2,4,5-трихлорофеноксиоцетна киселина.

Аминокиселините и органските додатоци во многу случаи не се потребни. Доколку неорганските компоненти не се доволни за раст на културата, најдобар начин за подобрување на подлогата е додавање 0,5-0,1% хидрозилат казеин. Истиот понатаму може да се замени со L-глутамин (2-10 mol), или пак органскиот азот потполно да се исфрли. На клетките обично им е потребно еден месец или повеќе, за постепено да се прилагодуваат на отстранувањето на органскиот азот. Додавање на кашесто ткиво од плодот на банана и рибина емулзија поволно делуваат во култура на орхидеја. Најчесто се употребуваат како органски додатоци течниот ендосперм на кокосовиот орех (кокосово млеко), слад од јачмен и екстракт од квасец (Jelaska, 1994).

2.5.1. Регулатори за раст на растенијата

Регулаторите за раст се органски соединенија, освен хранливи материи, кои во мали количини го промовираат, инхибираат или менуваат било кој физиолошки процес во растенијата. Синтетички хемикалии со слични физиолошки активности за растителни супстанции или соединенија, обично се нарекуваат регулатори за растење на растенијата (George et al., 2008). Тие се генерално класифицирани во следните групи; ауксини, цитокинини, гибелелини и абсциска киселина (Leva & Rinaldi, 2012).

2.5.2. Витамини

Културните растителни клетки и ткива можат да станат дефицитни во некои фактори. Растот и преживувањето потоа се подобруваат со нивното

дополнување на медиумот за култура (George et al; 2008). Најчесто се користат витамини тиамин (витамин Б1), пиридоксин (Б6), никотинска киселина (ниацин) и тиамин. Други витамини како што се биотин, фолна киселина, аскорбинска киселина (витамин Ц) и витамин Е (токоферол) понекогаш се додаваат во медиумските формулации. Миоинозитолот се додава во повеќето медиуми за растителна култура за да се подобри растот на културите, (Stewart, 2008).

2.5.3. pH-вредност на медиумот

pH медиумот е важен бидејќи влијае на навлегувањето на различните компоненти на медиумот, како и регулирањето на широк спектар на биохемиски реакции кои се јавуваат во културите на растителните ткива (Stewart, 2008). pH повисока од 6 дава прилично тврд медиум и pH под 5 не дозволува задоволително желатирање. Така, ефективниот опсег на pH за медиум на ткивна култура е ограничен (Bahita & Ashwath, 2005).

2.5.4. Извор на јаглерод

Повеќето растителни клеточни култури не се автотрофни и затоа се целосно зависни од надворешен извор на јаглерод, (Hall, 1999). Во повеќето случаи сахарозата е една од најчесто користените во ткивните култури. Глюкозата исто така се користи до одреден степен во последниве години, истражувањата покажаа дека малтозата е многу ефикасен извор на јаглени хидрати за подобрување на одговорот на растителните ткива во културата, (Khachatourians et al., 2002).

2.6. Типови на култури

По воведувањето на почетните експлантанти во *in vitro* услови, можеме да разликуваме главно два вида на раст на експлантантот и тоа: организиран и неорганизиран (Jelaska, 1994).

Организиран раст се јавува кога се култивираат организирани делови на растението (или органите) како што се: меристем, изданок или корен, лисни израстоци, млади цветни пупки и ситни плодови воведени во културата, каде што го продолжуваат својот развиток, при што ја зачувуваат својата почетна структура или, пак, кога овие истите структури (органи) се создаваат одново, *de novo*, од култура на претходно неорганизирани ткива. Терминот орган-култура вклучува асептичко издвојување од целото растение, одредени негови структури (органи) како што се: лист, лисни израстоци, незрели цветови и друго, и нивниот продолжен развој во услови *in vitro*.

Според Jelaska (1994), во зависност од видот на експлантант, можеме да ги разликуваме следниве типови орган-култура:

а) култури на цели непроменети растенија, се стерилизираат семињата и како такви се сејат во *in vitro* услови да 'ртат, што понекогаш може да се развие и цело растение.

б) култура на ембрион, се изолираат ембрионите од семенската обвивка;

в) култура на корени;

г) култура на антери;

д) култура на меристем;

ѓ) култура на изданок, кој ги опфаќа горниот меристемски изданок со еден или повеќе парови на лисни примордии;

е) култура на поединечни пупки, која се состои од странични пупки или врвни пупки кои се прицврстени за дел од стеблото.

Неорганизиран раст често се среќава во култура на растителни ткива. Ткивото кое се создава не содржи ниту една препознатлива структура од растителниот организам и има само ограничен број на различни диференцирани, специјализирани клетки, какви се препознаваат во растителниот организам. Потполно создавање на овие диференцирани клеточни ткива сè уште не е постигнато. Неорганизираното ткиво може да се

зголеми волуменски и со субкултивирање на тврд или течен медиум може да расте неограничено.

Во овој тип на раст на почетните експлантанти спаѓаат:

- Култура на поединечни клетки - растењето на поединечните клетки се постигнува со нивна изолација од калусот или култура на клетка во суспензија;

- Култура на протопласти - тоа е култура на клетка од која е отстранет клеточниот сид, протопластите остануваат сочувани и живи, а потоа се култивира на течен медиум (Jelaska, 1994).

- Култура на растителни ткива, ткивна култура или калус – калусното ткиво се состои од група на клетки кои се создаваат со неорганизиран раст на ситните растителни органи, откинати ткива, или од претходно култивирани клетки;

- Култура на клетка во суспензија - се состои од популација на клетки и мали групи на клетки кои се расфрлени и растат во течен медиум.

Неорганизирани / организирани култури е тип на раст кој е мешавина од претходните два споменати раста. Клетките и изолираните органи или ткива најпрво се дедиференцираат, кои со делењето создаваат ткива од кои понатаму се развиваат брзо органите (корени или изданоци) или цели организми (ембриони). Организираниите структури можат да се развиваат од неорганизирани култури, било да е спонтано или со посебни постапки. Во сите овие случаи потомството не мора да биде, а најчесто и не е потполно исто како мајчинскиот материјал од кој е создадена културата (Jelaska, 1994).

2.7. Култура на апикални и аксиларни пупки

За разлика од перманентната култура на коренот, културата на пупките има многу голема примена. Во оваа постапка, почетен материјал за размножување е врвот на стеблото, со големина од 1-3 mm, која опфаќа меристем и повеќе најмлади лисни примордии. Наместо врвот на стеблото, почетниот експлант можат да бидат и изолирани нодуси, што во пазувите на

листовите носат зачеток на аксиларните папки. Заради иницијација на развојот, врвот на стеблото се става на хранлива подлога, на која прво листовите малку се издолжуваат и се образува лисна розета. Таа подлога содржи висока концентрација на цитокинин, најчесто бензиламинопури (BAP). Освен на листовите, оваа подлога влијае и на растењето на аксиларните пупки, така што во првата фаза на микропропагација се добива многу разгранета грмушка на пупки, кои потоа се раздвојуваат и пренесуваат на нова подлога. Таа фаза е мултипликација, во која индексот на размножување, т.е. просечниот број пупки кој се развива од еден инокулум обично е од 4-10.

На подлогата за размножување пупките мора да останат сè додека не се добие саканиот број. Многу од нив на иста подлога спонтано се издолжуваат, но издолжувањето се подобрува ако се намали концентрацијата на цитокинините, а да се додаде гибберелин (Колева, Гудева 2010).

2.8. Фази на микроразмножување

Постапката на вегетативното размножување во услови *in vitro* може да се раздели на неколку фази (Murashige 1974; Deberg & Maene 1981). Професорот Murashige во 1974 година дефинираше три фази (I-III) во *in vitro* размножувањето на растенијата. Овие фази се широко прифатени од страна и на истражувачките и комерцијалните лаборатории за култури *in vitro*, бидејќи тие не само што ги опишуваат процедуралните чекори во процесот на микроразмножување, но ги претставуваат и главните точки кои животната средина на културата треба да ги промени.

Некои автори мислат дека првата фаза треба да се смета како подготвителна фаза. Па така, Debergh и Maene (1981) предложиле таа фаза каде што се вршат подготовките да се нарекува фаза 0, а четвртата фаза (IV), во која растенијата се пренесуваат во надворешната средина, исто така, да биде општо призната.

Култивирањето на растителниот материјал во *in vitro* услови поминува неколку фази, наведени во следните подзаглавја.

2.8.1.Нулта фаза

Ги вклучува сите постапки пред почетокот на културите *in vitro*, а тоа се состои во следното: правилна постапка со почетниот материјал, неговото чување во здрава состојба (стакленик без инсекти, чисти садови, полевање само со вода, чување на растенијата во релативно суви услови, добра здравствена заштита итн.).

Важно е да се истакне и тоа дека изворниот растителен материјал од кого ќе се земаат експлантатите и постапките што ќе се применат имаат критична улога за успешно поставување на микроклонирањето. Доколку генетската стабилност на употребните ткива варира, во тој случај експлантатите кои се употребуваат за култура ќе имаат влијание брз репродукцијата. Поради тоа се препорачува да се користат врвни меристеми бидејќи даваат одредена сигурност при отстранувањето на микроорганизмите кои се извор на зараза.

Секое растително ткиво може да се воведе *in vitro*. Да се зголеми веројатноста за успех, мајката растение треба да се одгледува *ex vitro* под оптимални услови за да се минимизира контаминацијата во културата на *in vitro* (Leva & Rinaldi, 2012).

2.8.2.Прва фаза - воведување во култура

Во оваа фаза се врши изолирање на стерилни меристеми од апиканите пупки. Доколку пак постои внатрешна инфекција, потребно е да се применат посебни техники, но најважно е во оваа фаза да се овозможи стерилно растење на експлантатите.

Дел од поставените култури, во зависност од нивната употреба и вредноста на почетниот генотип, може да се чуваат (како матичњак) и да служат за понатамошна употреба.



Слика 9. Изолирање на апикани пупки од каранфил (фотографија Велешанова, 2016 а)

Figure 9. Isolation of apical buds from carnation (photo Velesanova, 2016 a)

2.8.3.Втора фаза – размножување или репродукција

Тоа е фаза на размножување (мултипликација). Целта во оваа фаза е да се постигне размножување и зачувување на генетската стабилност. Самото размножување, пак, се извршува на повеќе начини. Меѓутоа, кој начин ќе биде употребен зависи од видот на растението, генотипот и од потребата за добивање на одреден број растенија. Така, на пример, при клонирање на растенија кои се употребуваат како родители при создавање на хибридно семе се користи метод на мултипликација, кој овозможува висок степен на генетска стабилност. Оваа специфичност може постапката да ја ограничи само со употреба на аксиларни пупки, а таа е и најстара метода. Всушност успешноста на мултипликацијата во голема мера зависи од хранливата подлога, како и од составот на хормоните и нивниот сооднос. Во фаза на мултипликација се добива многу разгранета грмушка на пупки, кои потоа се раздвојуваат и пренесуваат на нова свежа подлога. На подлогата за размножување пупките мора да останат сè додека не се добие саканиот број (Спасеноски, 2005).



Слика 10. а) Разгранета грмушка од каранфил, б) раздвојување и пренесување на изданоци на нова свежа подлога (Велешанова и сор. 2017)
Figure 10. a) Branched bush of carnation, b) separation and transfer of shoots to a new fresh medium (Velesanova et al. 2017)

2.8.4. Трета фаза – подготовка на културите за пренесување на културите во надворешни услови

Во оваа фаза се врши подготовка на изданоците или на регенеративните растенија добиени во втората фаза за пренесување во надворешни услови, односно во почва. Во овој случај потребно е да се овозможи издолжување и вкоренување на изданоците, било тоа да е во *in vitro* или *in vivo* услови. Ако се работи за изданоци истите се одвојуваат и пренесуваат на подлога за вкоренување. Меѓутоа, подлогите за индукција на корени може да варираат во зависност од растителниот вид за кој се употребуваат. Сепак, најчесто во нив се смалува или потполно отстранува присуството на цитокинини. Но има и такви видови кои лесно се вкоренуваат на почвен супстрат и во тој случај третата фаза се исклучува.

Вкоренувањето на изданоците е многу важен дел од секоја *in vitro* размножувачка шема. Кај некои видови формирањето на адвентивните корени кај изданоците е во текот на фаза III, но обично е неопходно да се користат специјални медиуми или методи за да се поттикне формирањето на корените.

Понекогаш изданоците треба да бидат поиздолжени пред да се изврши нивно вкоренување. За да се намалат трошоците кај микроразмножувањето, повеќето лаборатории ги отстрануваат некоренетите изданоци од *in vitro* средината и ги вкоренуваат во посебни садови за вкоренување. Затоа, кај културите каде микроразмножувањето се потпира на адвентивните или аксиларните изданоци, фаза III честопати е поделена, па Debergh & Maene (1981) предложиле да биде:

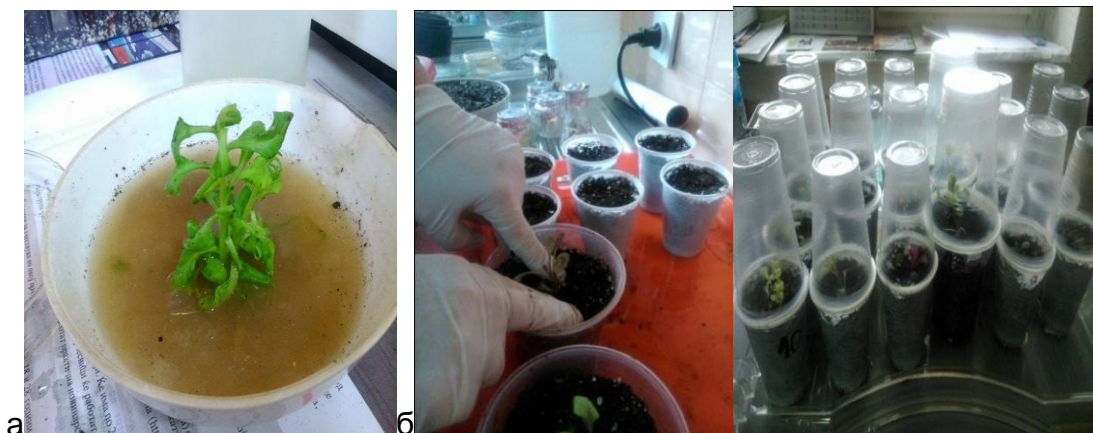
- Фаза IIIa, издолжување на пупките или изданоците формирани во текот на фаза II, за да обезбедат изданоци со соодветна големина за фаза IIIb ;
- Фаза IIIb, искоренувањето на изданоците од фаза IIIa *in vitro* или *extra vitrum*.

2.8.5. Четврта фаза – пренесување на младите растенија во надворешни услови

Во оваа фаза растенијата од епрувета се пренесуваат во почва, но и се прилагодуваат (адаптираат) за растење во надворешни услови.

Аклиматизацијата на целосните регенерантите се извршува со нивно пренесување на стерилна мешавина од перлит и тресет (1:1) во услови со висока влажност. При засадувањето на регенерантите во стерилната мешавина, корењата на регенираните растенија убаво се исчистуваат со пинцета од вишокот на хранлив медиум. Потоа коренчињата се измиваат со дестилирана вода и се третираат со фунгицид со концентрација од 0,5 ml/l Beveskore (Слика 11.а).

По засадувањето на регенерантите во стерилна мешавина се третираат со 20 ml $\frac{1}{2}$ MS и 20 ml 0,1 Mm ABA. На вториот ден од засадувањето на регенерантите на секоја од пластичните чаши се прави по еден отвор, а од третиот ден регенерантите се полеват со 5ml $\frac{1}{2}$ MS раствор (Слика 11.б).



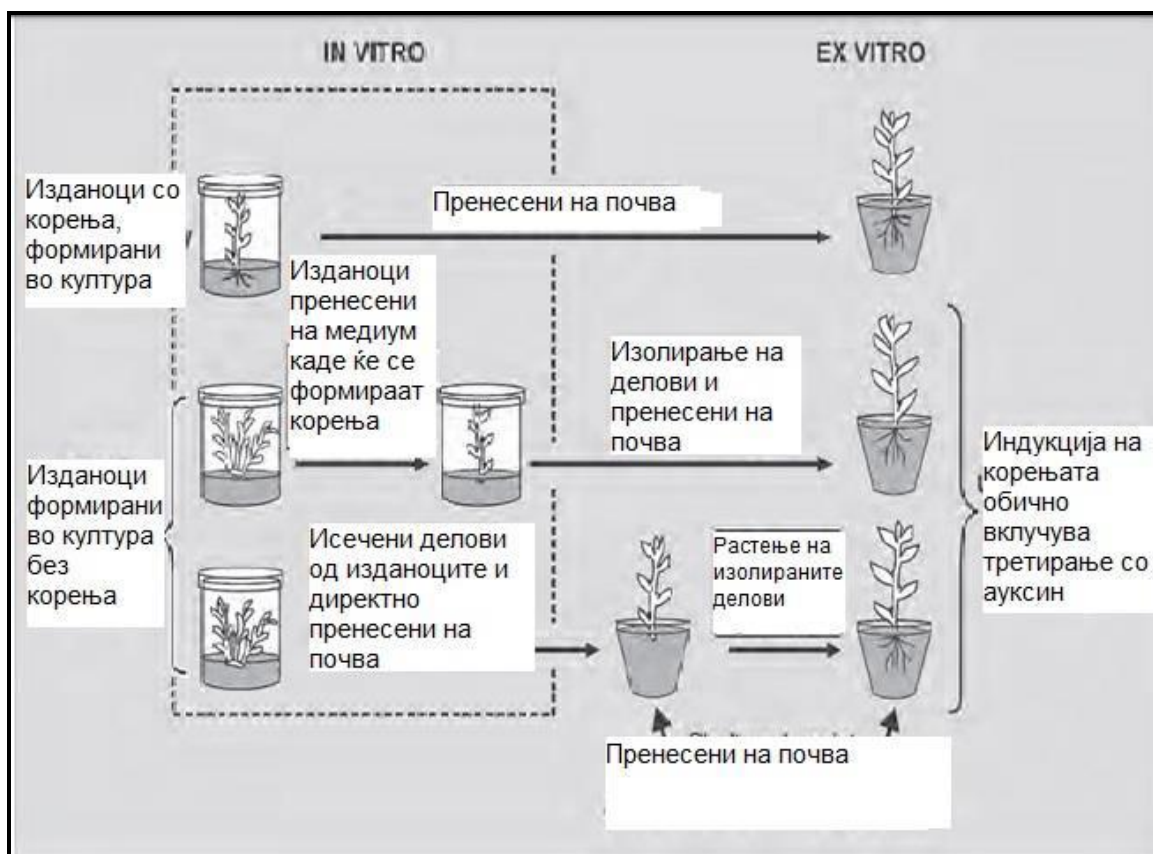
Слика 11. Третман на регенерат од каранфил со Beveskore пред засадување во стерилна мешавина (а); *De novo* регенеранти засадени во стерилна мешавина од тресет и перлит и третирани со ABA регулатор на раст за аклиматизација (б) (фотографија Велешанова, 2016)

Figure 11. Treatment of carnation regenerant with Beveskore before plantation in sterile mix (a); *De novo* regenerants planted into sterile mix of peat and perlite and treated with ABA growth regulator for acclimatization (b) (photo Velesanova, 2016).

Аклиматизираниите растенија на поголема оддалеченост се пренесуваат пакувани во влажен памук или хартија или во пластични вреќи, но треба да се внимава на температурата, особено ако се тропски видови кои тешко поднесуваат температура пониска од 15°C (Jelaska, 1994).

Ако не се изврши преносот внимателно, може да резултира со значително губење на пропагираниот материјал. Постојат две главни причини за загубата на пропагираниот материјал: изданоците кои се развиваат во култури се произведени во висока влажност и ниска осветленост. Ова резултира со листови кои имаат помалку епикутуларен восок или восок со изменет хемиски состав, во споредба со растенијата одгледувани во расадници или стакленици. Кај некои растенија произведени во *in vitro* услови стомите на листовите можат да бидат нетипични и неспособни за нивно целосно затворање под услови на ниска релативна влажност. Од тие причини, растенијата кои се образуваат во култура на ткива ја губат водата многу брзо кога ќе се пренесат во надворешни услови (Sutter и Langhans, 1979; 1980).

Промените кои се случуваат, откако растенијата имаат поминато период од неколку дена *in vivo*, се прикажани на Слика 12.



Слика 12. Алтернативни методи за вкоренување на изданоците добиена со микропропагацијата (George, 2008)
Figure 12. Alternative methods for rooting of micropropagated shoots (George, 2008)

2.9. Значењето на микропропагацијата

Преставува моќна алатка за производство на многу хортикултурни видови, вклучително и декоративни растенија. Во култура на меристемски пупки, почетен материјал за размножување е врвот на стеблото, со големина од 1-3 mm, која опфаќа меристем и најмногу 1-2 лисни примордии. Заради иницијација на развојот, меристемската пупка се култивира на хранлива подлога со висока концентрација на цитокинин, најчесто бензиламинопурин (BAP). Во фаза на мултипликација се добива многу разгранета грмушка на пупки, кои потоа се раздвојуваат и пренесуваат на нова свежа подлога. На подлогата за размножување пупките мора да останат сè додека не се добие саканиот број. Ожилувањето се индуцира на изданок што достигнал должина од најмалку 1-2

ст, на подлога што содржи регулатори на раст за индукција на адвентивни корења. Ожилените растенија се пренесуваат во нестерилни услови и постепено се аклиматизираат на природна средина (Колева-Гудева, 2010).

Терминот „култура на меристеми“ подразбира култивирање на меристем без листни примордии или најмногу 1-2 листна примордија кои се исцрпени и култивирани, (Rout et al., 2006). Исто така е најсигурна техника за масовно размножење, бидејќи обезбедува генетска стабилност за време на процесот на регенерација (Scocchi et al., 2004).

2.10. Сузбивање на вирусите

Микропропагацијата има посебна, многу значајна улога во борбата за сузбивање и елиминирање на растителните вируси. Бидејќи вирусите по правило не се наоѓаат во меристемските клетки, со размножувањето на здравиот материјал во култура се добива здраво вегетативно потомство. Исто така, ако од заболено растение се изолира меристем, може да се добие потомство ослободено од вирус. Процедурата која се применува во суштина не се разликува од постапката за размножување на пупките *in vitro*, само е потребно почетниот експлантат да биде што помал, за да не се изолираат и трајни клетки кои содржат вируси. За таа цел, најдобро би било да се изолира само апикален меристем, но вегетационата купа без листни примордии во култура не може да се развива во стебло и дава само калус. Затоа, на експлантатот се оставаат две најмлади примордии, чие присуство е доволно за нормален развој. Додека пупките се размножуваат во култура тие остануваат стерилни. Но, кога ќе се изнесат во природни услови, растенијата мораат да се заштитат со мрежи и хемиски средства од инсекти кои се преносители (вектори) на вируси. Многу овошни, градинарски и украсни растенија така се одгледуваат како здрав саден материјал, а прописите на многу земји бараат уверение дека растенијата се тествани (virus-tested) и ослободени од вируси (virus-free) или безвирусен материјал (Колева-Гудева 2010).

Вирусите по правило не се наоѓаат во меристемските клетки, затоа почетниот експлантат треба да биде што помал, за да не се изолираат и трајни клетки кои содржат вируси (Колева-Гудева, 2010).

2.11.Предности на микропропагацијата

За професионални производи на култури *in vitro* важно е да се напомене дека постапката има голема предност и истата се состои во следното:

- новите сорти може комерцијално брзо да се размножуваат и на тој начин на пазарот да се понудат за кус временски период;
- може брзо да се постават мали родителски клонови за добивање на F_1 хибриди;
- исто така селекционерите можат многу брзо да постигнат солидни мутанти со иницирање (индукција) на адвентивни пупки и изданоци;
- културите *in vitro* посебно се корисни за формирање банка на гени која чува здрав, односно ослободен од вируси растителен материјал, на ниски температури и мал простор.

Некои растенија е потребно да се размножуваат вегетативно, бидејќи полово се стерилни (хаплоиди, стерилни мутанти, линии кои носат цитоплазматична машка стерилност), а потребни се за добивање на хибриди (добиеени растенија по пат на вкрстување), исто така и ретки анеуплоиди или растенија со невообичаени хромозомски комбинации кои би можеле да се изгубат доколку се размножат со семе, како и посебни хетерозиготни генетски комбинации (Dale & Webb, 1985).

2.12. Недостатоци на микропропагацијата

Потребни се напредни вештини за успешно спроведување на недостатоците кај *in vitro* методите и тоа:

- генетската стабилност во некои случаи е многу ниска (на пример, при размножување со вегетативни изданоци и со соматски ембриони во калусни култури);
- некои растенија од култура пренесени *in vitro* услови покажуваат растење во вид на грумушка;
- кај поголем број на дрвенести растенија во *in vitro* услови многу е тешко да се индуцира образување на корени.

Исто така и пренесувањето на растенијата од *in vitro* во *in vivo* услови е доста сложен и тешок процес.

Потоа микроклонираниот генотип, кој на крај се пренесува во полски услови на отворено може да биде осетлив на болест, а како резултат на тоа да биде уништен од патогените организми кои го напаѓаат. Поради тоа, за заштита на растенијата кои се произведени *in vitro* неопходно е, во дадени случаи, да се користат интензивни заштитни мерки.

Во *in vitro* услови регенеративната способност може да се изгуби после одреден број на супкултивирања на калусно тиво или клетки. Во некои случаи стерилно излолирање на експлантатите е многу тешко.

Садниците пропагациите во *in vitro* услови може да се добијат на три начина: а) преку индукција за растење на аксиларните пупки; б) образување на адвентивни изданоци; в) преку соматска ембриогенеза. Секоја од овие три методи има свои предности и негативности, односно недостатоци.

Во тој случај ќе бидат опишани постапките кои се применуваат за вегетативно размножување кај организирани структури, односно преку култура на меристем, вегетативниот врв (апикални пупки) и аксиларни пупки. Методи пак за клонирање на растенијата *in vitro* се: поединечни нодиски сегменти (резници), како и аксиларно гранење и регенерација на адвентивни органи (корени и изданоци) на експлантатите.

2.13. Регенерација на адвентивни пупки и изданоци

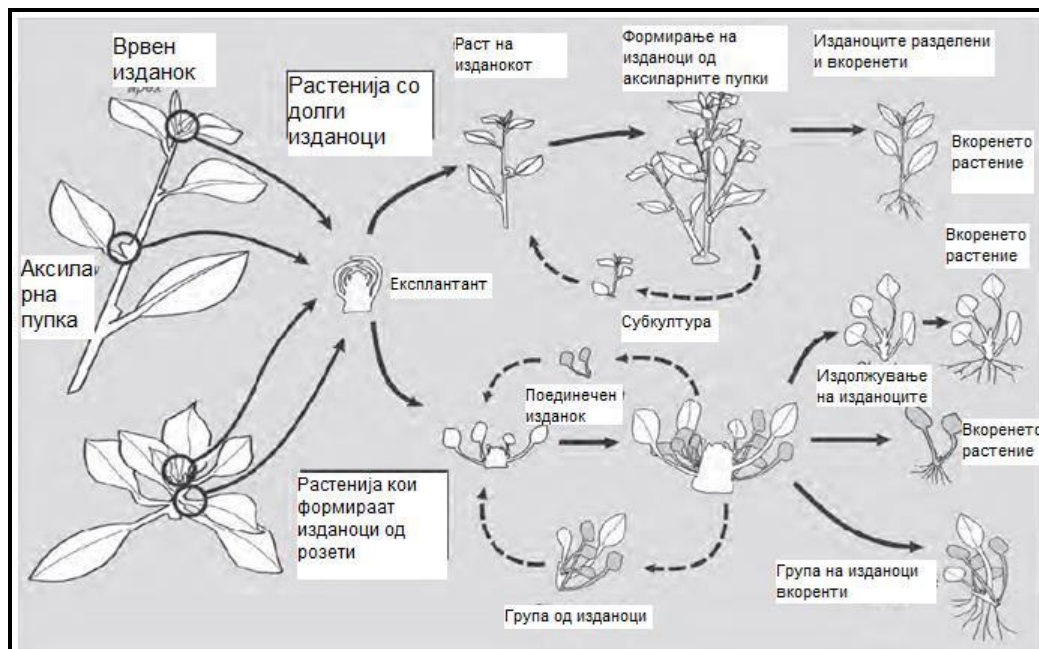
Досега и во секојдневната практика се врши вегетативно размножување кај некои растителни видови преку формирање на адвентивни изданоци. Постојат одредени причини зошто методот на адвентивни пупки не е толку популарен во споредба со методот на формирање на адвентивни изданоци. Бројот на растителните видови кои се во можност да формираат адвентивни изданоци *in vivo* или *in vitro* многу е помал од растенијата кои се способни да образуваат адвентивни корени. При формирањето на адвентивни изданоци и адвентивни корени има доста сличности. Во голем број случаи формирањето на адвентивни пупки или изданоци е поттикнато од страна на светлината, односно светлосниот интензитет и квалитет може да има многу важна улога. Постои и одреден број растителни видови на кои за формирање на адвентивни изданоци им е потребен мрак (темно). Во некои случаи интензитетот на осветлување, како и квалитетот, може да се замени ако во подлогата се додаде ВА. Во овој случај, без оглед на светлосниот квалитет, добиен е сличен број изданоци и тоа со ист квалитет, но бројот на изданоци бил поголем од бројот добиен на медиум без цитокинини.

Кај други видови за формирање на изданоци била потребна превисока температура. За образување на адвентивни изданоци потребни се и растителни хормони, односно ауксини, и цитокинини. Кај некои растителни видови не се потребни ниту ауксини, ниту пак цитокинини. Тоа не значи дека додатокот на цитокинини или ауксини не би имало позитивно или негативно влијание врз формирањето на изданоците. Кај лијаните и зумбулите за формирање на изданоци потребно е да се додаде егзогено ауксини. Кај поголем број растителни видови, за образување на адвентивни изданоци во култура *in vitro*, треба додавање на цитокинини додека аукилот ја спречува нивната појава. Сепак, кај најголем број на растителни видови за формирање на изданоци потребно е присуство на мали концентрации на ауксин, но поголеми концентрации на цитокинин. Таков пример е кај бегонијата.

Кај растенијата кај кои за регенерација на изданоци се потребни двата хормона, односот на цитокининот спрема ауксинот секогаш е во корист на цитокининот, односно висока концентрација на цитокининот а ниска

концентрација на ауксинот. Цитокининот ВА е еден од најдобрите за многу растенија и широко се употребува, а посебно кај четинарите. Кога се користи ВА, посебно во високи концентрации, треба да се има предвид дека се можни отстапувања во морфологијата на изданоците. Понекогаш во подлогата за формирање на изданоци се додаваат комбинации од цитокинини и аденин сулфат.

Во најголем број случаи со зголемување на концентрацијата на гиберелин обично се стопира формирањето на адвентивни изданоци, апцизинската киселина нормално го инхибира формирањето на адвентивни изданоци, а само кај некои растенија го поттикнува истото.



Слика 13. Култура на изданок (George, 2008)
Figure 13. Shoot tip culture (George, 2008)

2.14. Која растителна култура може комерцијално да се микропропагира?

Според Jelaska (1994) постојат четири важни причини дали некое растение може да се размножува во *in vitro* култура, а тоа се:

→ Брза репродукција (*in vitro* методите засега се најбрзи во споредба со сите други методи);

- Да не е заразена културата од патогени микроорганизми;
- Добивање на генерации со единствени генотипови и фенотипови, кои не можат да се репродуцираат на никаков друг начин и
- Економска оправданост – утврдување на цените на пазарот.

Во многу случаи, првите три причини упатуваат на потребите за продукција *in vitro*, а четвртиот фактор ја одредува можноста за нејзина комерцијализација.

2.15. Примена на технологијата на култура на ткиво во *in vitro* услови

Производството и одржувањето на растенијата со култура на ткива денес масовно се користи затоа што за кратко време и на мал простор од едно растение може да се добијат неограничен број на генетски идентични единици. Досегашните научни истражувања покажуваат дека методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива наоѓа голема примена кај повеќе видови, а литературните податоци се сведоци за примената на најразлични типови на експлантати (George, 1996).

Комерцијалната микропропагација е основа на технологијата кој се развивала повеќе од дваест години. Културата на ткиво во *in vitro* услови продолжува да се развива во стерилни услови, културата мора да расте во стерилни затворени садови како експлантанти на хранлива подлога во која се додаваат шеќер и други хранливи состојки кои се стерилизираат. Исто така, пренесувањето и сечењето на растенијата се одвива во стерилни услови Jelaska (1994).

Рачната манипулација сè уште е база во оваа индустрија: ткивата и изданоците се раздвојуваат со употреба на дисекциски инструменти и рачно се пренесуваат на подлогата или супстратот. Аклиматизацијата во заштитниот простор или на отворен простор, се врши со помош на оросување или создавање на магла во заштитниот простор Jelaska (1994). Сепак, недостатокот во пазарот за микропропагација е автоматизацијата.

Примената на трансплантантите овозможува зголемено добивање на вегетативни садници. Според тоа, поврзувањето на микроразмножувањето со автоматските расположливи конструкции за пренесување на садниците и малите резници, сè повеќе и повеќе се развиваат и ќе продолжат и понатаму да се користат. Може да се заклучи дека нема запирање во примената на микроразмножувањето на растенијата, вкоренувањето или постапките при преносот со кои би се ограничило производството во индустријата (Jelaska, 1994).

2.16. Комерцијално микроразмножување

Производството на *in vitro* растенија е скап процес. Најголем дел од трошоците отпаѓаат на лабораториско работење. Апаратите трошат многу голема количина на енергија за ладење и загревање, осветлување и автоклавирање. Основната опрема во лабораторијата за култура на ткива ги вклучува варијабилните трошоци и фиксните трошоци. Вообичаената типична потреба за производство на 500.000 растенија годишно би се проценила со вредност на опремата од околу 250.000 долари и некои додатни месечни трошоци од околу 500 долари (Larcher, 2003).

Цената на производот од микропропагацијата се одредува според: трошоците за работна рака, потрошениот материјал, производството во лабораторија и заштитен простор, платата на вработените, општите трошоци и администрацијата (Larcher, 2003). Треба да се процени дека може да дојде до контаминација, миењето на садовите и подготовката на подлога, што исто така се додатни трошоци кои би требало да се пресметаат.

За производство на едно *in vitro* растение може да се продава најевтино 0,15 долари. Според тоа, реалната цена за производство на растителен материјал во *in vitro* услови е помеѓу 0,25 и 0,30 долари (Larcher, 2003).

2.17. Досегашни истражувања за примена на *in vitro* техниките кај декоративните видови

2.17.1. Црвена декоративна зелка (*Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given*)

Yang et al. (1991), Hossain et al. (1995), Munshi et al. (2007), Pavlović et al. (2010), користеле хипокотилии котиледони од декоративна зелка (*Brassica oleracea* cv.) на подлоги MS+1,0 mg/l BA, MS + 0,5 mg/l IBA, MS + 0,5 mg/l IBA, MS+1 mg/l BA, MS + 0,1 mg/l KIN, MS + 0,2 mg/l IBA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиени се изданоци.

Gerszberg et al. (2014) исто така користел хипокотил од декоративна зелка (*Brassica oleracea Kyoto red given*) како резултат на различните концентрации на хормони на раст на MS подлогата MS + 4,4 μ M BAP + 0,537 μ M NAA добил калус.

Lazzeri & Dunwell (1984), исто така ја следеле *in vitro* регенерацијата на декоративна зелка во MS, збогатена со BA и KIN. KIN се покажал дека е помалку ефикасен. По две до три недели била забележана индукција на калус од котиледони во различни хормонални концентрации и комбинации. Најдобар калус од декоративна зелка е добиен на MS подлогата која содржи 1,0 mg/l 2,4-D и 0,5 mg/l NAA, на истата подлога е поставено и хипокотил каде, исто така, било забележано калус индукција.

Според, Chowdhury и Prakash (1992) хипокотилот се покажал како најголем потенцијал за регенерација во споредба со котиледоните. Хипокотилните експлантанти се исто така ефикасни за регенерација и мултипликација на меристемска пупка во *in vitro*.

Pavlović et al. (2010) извршиле испитување на ефектот на регулаторите на растот врз развојот на хипокотил и котиледони и мултипликацијата *in vitro* на генотипот *Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given*. Хипокотилите и котиледоните биле засеани на подлога Murashige и Skoog (MS), а подлогата била дополнета со различни хормонални комбинации 1 mg l⁻¹ 6-бензилавенин

(BA) или (KIN) во комбинација со 0,1 и 0,2 mg/l индол-3-бутирна киселина (IBA). Експлантатите од хипокотил се покажале најдобри со минимален регенеративен потенцијал од 75%. Некои од медиумите биле дополнети со BA и биле оптимални и за регенерација и за мултипликација.

Според истражувањата на Munshi et al. (2010) била забележана индиректна регенерација на калус од експлантати на котиледони. Максимален процент на формирање на калус бил забележан на MS што содржи 1,0 mg/l 2,4-D и 0,5 mg/l NAA. Регенерацијата не била постигната во калусот добиен од хипокотил. Вкоренувањето било постигнато во рок од 10-12 дена, добро вкоренетите растителни растенија, кои биле вкоренети во *in vitro*, успешно се пренесувале на почвата, а нивната стапка на преживување во природната средина била 86%.

Gerszberg et al. (2014) вршел испитување на осум сорти на *Brassica oleracea* користел два вида на експлантати (хипокотил и котиледони) биле тестирани да се регенерираат во *in vitro* услови. Експлантатите од хипокотил и котиледони биле засеани на MS подлога дополнети со 1% сахароза и различни концентрации и комбинации на регулатори за растење на растенијата. Експлантатите од хипокотил формирале калус додека котиледоните не образувале калус за сите тестирани видови.

Li et al. (2003) заклучиле дека вишокот на цитокинини заедно со високиот потенцијал на вода во медиумот биле главна причина за витрификација на пупка.

Pavlović et al. (2010) од нивните резултати се покажала задоволителна регенерација на пупки од експлантанти на хипокотил и мултипликација на пупка на медиуми кои содржат 1 mg/l BA или во комбинација со IBA во четирите испитувани сорти *B. oleracea*.

Според истражувањето на Gupta et al. (1980) добиле само две пупки кога користеле експлантат од хипокотил на MS медиум дополнет со 0,1 – 2,0 mg/l BA. Тие исто така забележале дека во медиумот дополнет со KIN и BA имало само две до три адвентивни пупки.

Caboni & Tonalli (1999) објавиле дека IBA е најефективниот ауксин за индукција на коренот кај широк спектар на растителни видови. Исто така, било откриено дека IBA е супериорна во однос на IAA и NAA поради нејзината постабилна природа Hutchinson (1995), Litz and Jaiswal (1990).

Cardoza and Stewart (2004) тестирале способност на два вида експлантати од зелка хипокотил и котиледони, за да се регенерираат преку индиректна органогенеза. Хипокотилите и котиледоните биле култивирани на MS кои содржат BAP сам или во комбинација со NAA за промовирање на пупки и мултипликација. Во принцип, калусот лесно се добива, при што хипокотилите произведуваат многу повеќе калус од котиледони. Калусот добиен од хипокотил произвел поголема фреквенција на регенерација на пупки од калусот добиен од котиледон. Фреквенцијата на регенерација на пупки варираше помеѓу сорти, експлантен тип и медиум за долги временски периоди. Ова може да резултира од протекување на фенолни соединенија од експлантанти до медиумот проследено со нивна оксидација со што се создаваат токсични соединенија, а видовите *Brassica*, вклучувајќи зелка, се богати извори на фенолни соединенија.

Chenget et al. (2001) присуството на BAP во медиумот значително го зголемувал бројот на пупки произведени по експлант за брзо време кај *B. Oleracea* во *in vitro* услови.

Guo et al., (2005) вели дека додавањето на NAA покажало дека значително ја подобрува регенерацијата на пупки. Затоа, тие користеле медиуми кои содржат BAP сам или во комбинација со NAA. Максималниот број на пупки по експлант е (7,5) добиени од експлантати на хипокотил, култивирани на MS + 4,44 μ M BAP.

Bhala & Singh (2008); Cogbill et al., (2010) во повеќето видови *Brassica*, регенерацијата зависи од возраста на експлантатите (Bhala&Singh 2008; Cogbill et al., 2010), при што помладите експлантанти резултираат со подобри реакции (Ovesna et al., 1993)

2.17.2. Петунија (*Petunia* sp.)

Kulpaet et al. (1989), Dewiret et al. (2007), Abu-Rayya et al. (2010) користеле меристем и котиледони од петунија (*Petunia* sp.) на подлоги MS + 1,0 mg dm⁻³ IAA, MS + 10 mg dm⁻³, MS + 2 mg/l BA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиени се изданоци.

Додека Thirukkumaran et al. (2009) користел котиледони од петунија и како резултат на различни концентрации на хормони на раст на MS подлога добил лисна розета.

Nowak et al. (2011) вршела испитување да се утврди влијанието на ауксините, цитокинините и гибберелинската киселина врз цветовите во *in vitro* услови. Најдобри резултати во фазата на размножување се добиени на MS медиум дополнет со 0,5 mg dm⁻³ GA₃. Растенијата на петунија, пропагирани под овие услови, развиле голем број лисја и пупки. Растенијата со најдобро развиен коренов систем биле регенерирани на MS медиум дополнет со 0,5 и 1 mg•dm⁻³ IAA. Иницијацијата на цвеќе треба да се изврши со користење на MS медиум дополнет со 0,5 mg dm⁻³ KIN.

Abu-Qaoud et al. (2010) го проучил ефектот на различни нивоа на 1-нафтил оцетна киселина (NAA) и N₆-бензиламинопурин (BA) при мултипликација на пупка и регенерација на *Petunia hybrida*. Семето на *Petunia hybrida* било 'ртено *in vitro* на MS базален медиум. За мултипликација експлантатите биле земени од базалниот медиум и биле култивирани на MS медиум дополнет со различни концентрации на BA (0,1, 0,4, 0,8 mg/l) и NAA во концентрација од 0,1 mg/l. Највисок број на аксиларни пупки се добиени на медиум дополнет со 0,8 mg/l BA и 0,1 mg/l NAA. Исто така, земени се котиледоните и се култивирани на MS медиум дополнети со три нивоа на BA (0,1; 0,4; 0,8 mg/l) и 0,5 mg/l NAA. Највисок процент на регенерација (45%) била забележана во MS медиум дополнет со 2 mg/l BA.

Исто така, за проценка на соматонални варијации, екстракт од странични пупки се земени од розово обоени растенија од петунија кои се одгледуваат во стаклена градина. Пупките биле дезинфицирани и култивирани

на базалните медиуми на MS кои се снабдени со 30 mg/l гентамицин сулфат и 30 mg/l Benlate. Откако пораснале пупките и лисните делови биле земени и се одгледуваат на медиум за регенерација на пука (MS медиум дополнет со 2 mg/l BA). Регенерираните пупки биле култивирани на MS медиум без регулатор за раст. Овие пупки потоа биле вкоренети, аклиматизирани и пренесени во стаклена градина за евалуација. На растенијата се појавиле две форми на лист (орбикуларна и елиптична) и три цветни бои (виолетови, виолетови и светло розеви).

Според истражувањата на Dixon (1985) висок процент на семе од петунија бил постигнат на агар медиум без регулатори за раст. По 3 недели, сите семиња успешно прортале на базалниот медиум. Тие продолжиле да растат на овој медиум еден месец сите садници биле чисти без контаминација.

Ornam (2010) вршел испитување на BA и NAA. NAA не влијае значително врз регенерацијата додека BA покажал значителен ефект врз регенерацијата.

Според, Christianson et al. (1985) регулаторите на раст индуцираат способност на ткивото да се реагира на понатамошни развојни сигнали.

Shi et al. (1994) вели дека клетките честопати реагираат поинаку во различни фази на развој и може да се појават интеракции помеѓу ауксин и цитокинин. Вклучувањето на цитокинин во медиумите овозможува калус. Уште поважно, цитокининот овозможува иницијација на мултицелуларните меристематички региони.

Renaudin et al. (1991) утврдил дека немало регенерација од *Petunia hybrida*, субкултурализирана на медиум со ниски концентрации на цитокини.

Од анализите на Pollard et al. (1990) бројот на адвентивните пупки произведени од експлантатите може лесно да се регулират со менување на концентрацијата на BA во културата.

Bouman et al. (1996) го испитува степенот на варијабилноста на формата на лист од украсни растенија. Големо зголемување на варијабилноста била забележана по регенерацијата од неорганизиран калус. Варијација била забележана и во боја на цвет.

Според Rout et al. (1994), гиберелинската киселина и цитокинините (особено BAP и TDZ) се сметаат регулатори за раст одговорни за поттикнување на цветови во *in vitro*.

Dewir et al. (2007) ги проучувале ефектите од GA₃ при значително повисоки концентрации - 10 mg dm⁻³ резултирале со формирање на цвет во 83% од експлантатите.

Kulpaet al. (1989), Dewiret al. (2007), Abu-Rayya et al. (2010), користеле меристем и котиледони од петунија (*Petunia*) на подлоги MS + 1,0 mg dm⁻³ IAA, MS + 2 mg/l BA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиени се изданоци, додека Thirukkumaran et al. (2009) користел котиледони од петунија и, како резултат на различни концентрации на хормони на раст на MS подлога, добил лисна розета.

2.17.3. Каранфил (*Dianthus* sp.)

Според истражувањата на Kanchanaroomet al. (2009) биле култивирани сегменти од лист на MS медиум дополнети со комбинации на NAA и BA. Регенерацијата со висока фреквенција била добиена од листовите култивирани на MS медиум дополнет со 0,05 mg/l NAA плус 3 mg/l BA.

Marković (2014) во фазата на мултипликација го испитувала ефектот на различни концентрации на BAP и NAA, тип на експлант, концентрација на MS и разни pH-вредности на хранливиот медиум. Најуспешната регенерација на *Dianthus* била на супстрати со ниски концентрации на хормони: 0,44 µM BAP и 0,54 µM NAA. Оптималната pH-вредност на хранливиот медиум во фазата на мултипликација на *Dianthus* е 5,8.

Erst et al. (2014) семето го користеле како почетен материјал за пропагирање *in vitro*. Експлантатите биле култивирани на MS медиум дополнет со BAP и NAA. Најголем број пупки се добиени при дополнување на 3 µM BAP. Овој медиум обезбедил директна морфогенеза без појава на соматонални

варијанти. Регенерантите од *Dianthus* биле успешно прилагодени и пренесени на експерименталното поле.

Истражувачката работа на Ali et al. (2008) вклучува формирање на пупка, нивно множење и искоренување во каранфил. За формирање на пупки биле користени и апикални и нодални меристеми. Најдобар одговор за формирањето на пупките е добиен по истекот на 6 дена од иницијализацијата на апикалниот меристем и по 7 дена на инокулација од нодален меристем на MS медиум дополнет со 4,0 mg/l BAP. Апикалниот меристем покажал поизразен ефект за формирањена пупка отколку нодален меристем. Добро развиените пупки биле префрлени за нивно размножување. Максимален број на пупки се добиени на MS медиум кој содржи 1,0 mg/l BAP.

Lubomski & Jerry (1989), исто така, објавија дека најдобро формирање на пупки од каранфил е на MS медиум дополнет со BAP.

Bressan et al. (1982) го дискутирал потенцијалниот ефект на експлантатите од апикалниот и нодалниот меристем.

Kovac (1995), исто така, објавил највисока мултипликација на пупки од каранфил на MS медиум кој содржи 1,0 mg/l BAP. Иако 2,0 mg/l BAP, исто така, покажал добар одговор за мултипликација на пупка, но времето потребно за мултипликација на пупките било повеќе, а бројот на пупки бил релативно помал од 1,0 mg/l BAP.

Сепак, However Van (1992) and Yanrcheve et al. (1998) објавиле дека најголем број на пупки по експлантат добиле на MS медиум кој содржи 0,9 mg/l BA и 0,3 mg/l NAA.

Подобра мултипликативна реакција на мултипликација во течни медиуми, исто така, била забележана од Fisher et al. (1993), Majada et al. (1997) во каранфил.

Pareek & Kothari (2003) ја опишуваат успешната постапка за директна соматска ембриогенеза (без формирање на калус) за *Dianthus barbatus* и *Dianthus chinensis* со одгледување на сегмент од лист во *in vitro*, Pareek et al.

(2004) ги размножиле наведените два вида но како експлантати користеле врвни и нодусни резници.

Nugent et al. (1991) користел листови, сегменти од интернодијата и цветна дршка. Најголем процент на формирање на изданок добил кај најмладите сегменти од интернодијата. Растенијата регенерирани од сегментите од интернодијата растеле побрзо за разлика од растенијата регенерирани од листовите и цветната дршка.

Altvorstvan et al. (1995) користел експлантати од листови, аксиларни пупки и сегменти од интернодијата. Нивото на регенерација на пупка не е зависело од големината на аксиларната пупка и нејзината позиција во однос на апикалот меристем, но зависи од положбата на листовите и сегменти на интернодијата. Експлантатите најблизу до апикалниот меристем покажале најголем степен на регенерација.

Petru & Landa (1974) успешно регенерирале адвентивни изданоци, како експлантати користеле врвен меристем и хипокотил.

Earle & Langhans (1975) преку култура на изданок го покажале позитивниот ефект на комбинација ауксин и цитокинин во медиумот.

Roest & Bokelmann (1981) ја опишуваат појавата на пупки од каранфил во присуство на BAP.

Според резултатите на Messeguer et al. (1993) и Radojević et al. (1997) концентрацијата на BAP повисока од 1,0 mg/l го зголемува бројот на пупки.

Leshem (1986) каранфилските пупки најчесто биле без хормонски медиум или на медиум со ауксин (Petru & Landa 1974; Radojević et al. 1997).

Stone (1963), Davis et al. (1977) за микропропагација на видовите *Dianthus*, најчесто употребувани ауксини IAA и NAA како и цитокинини, KIN или BAP.

Според истражувањето на Radojević et al. (2006, 2010) покажал дека двата процеса на органогенеза и соматска ембриогенеза можат да се појават истовремено кај видовите на *Dianthus* sp., но сепак органогенезата била поизразена од соматска ембриогенеза.

Jethwani и Kothari (1993) одгледувале котиледони од двата вида (*D. barbatus* и *D. chinensis*) индуцирале адвентивни изданоци на подлога со BAP и NAA кои потоа вршеле ожилување на подлога без хормони.

Исто така, Jethwan et al. (1994) извршиле микропропагација на двата типа на каранфил и Khawar et al. (2007) размножиле *D. barbatus* од култура на меристем и нодусни резниции (само првиот нодус под апикалната пупка). Кај видот *D. chinensis* постигната регенерација на изданок од калус. Калусот е добиен со одгледување на базални сегменти од листови на MS медиумот со додавање на 2,4-D (2,4-дихлорофенокси оцетна киселина). Како резултат на тоа, калусот бил пренесен на свежа подлога со различен состав, а изданоците биле само индуцирани од калусот кој се одгледувал за време на субкултура на медиум со BAP во комбинација со фенил оцетна киселина (Jethwani и Kothari, 1996).

Kanta и Kothari (2002) извршиле индукција на адвентивни пупки од *D. Chinensis* без формирање на калус. Исто така, кај *D. barbatus*, адвентивните изданоци биле формирани од органогенезата на калусот индуцирана од експлантати од лист. Формираните изданоци се одгледувани на медиум дополнет со GA₃ со цел да се издолжат, потоа биле ожилени на MS подлога со 2 mg/l IBA а добиените растенија успешно се аклиматизирале Pareek (2005).

Nakano и Mii (1993) извршиле соматска хибридизација на видовите *D. barbatus* и *D. chinensis* со примена на фузија на протопластите, а потоа од добиените хибридни клетки, го регенерирале калусот и по 5 месеци органогенеза на калусот добиле изданоци. Изданоците биле ожилени, а добиените растенија процветале во услови *in vitro*.

Fraga et al. (2004) вршеле елиминација на вирус кој преставува голем проблем во микропропагацијата. Најпрво од матичните растенија кои растат во стаклена градина биле изолирани меристеми (големина 0,3 mm) кои се развиле во изданоци и ги одгледувале 3 месеци на 24°C, а потоа и во наредните 6 недели на 37°C. Од преживеаните изданоци повторно ги излолирале меристемите, неколкупати ја повторувале целата постапка додека тестовите не покажале дека растенијата биле ослободени од вирус. Добиените безвирусни растенија повторно се пропагирале.

Ali et al. (2008) користел меристем од каранфил (pink) на подлога MS+ BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиена е лисна розета.

Waseem et al. (2009) користел аксиланри пупки од каранфил (pink) на подлога MS + 0,1 mg/l IAA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиен е калус.

Frey et al. (2009) користел аксиланри пупки од каранфил (pink) на подлога MS + 3 μ M 2,4-D. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиен е изданок.

Attia et al. (2012) користела хипокотил од каранфил (pink) на подлога MS + 0,3 mg/l IAA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиен е изданок.

Anand et al. (2014) користел аксиларни пупки од каранфил (pink) на подлоги MS + 2, 4-D 2 mg/l + BAP 1 mg/l, MS + BAP 4 mg/l. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлогите добиен е калус и лисна розета,

2.17.4. Агератум (*Ageratum* sp.)

Од анализите на Sarma (2008) биле инудуцирани меристемски пупки на MS медиум кој го надополнувал со различни концентрации и комбинации на ауксини и цитокинини.

Mohammadi (2017) ги испитувал ефектите на MS медиумот дополнет со различни концентрации на комбинација Kin и IAA за индукција на калус, коренска индукција и мултипликација, како и формирање на различни експлантанти на *Ageratum* sp. Максималниот број на формирање на калус бил забележан од котиледони на 1-1 и 4-4 (mg/l) и апикален меристем 2-2 (mg/l) на комбинација KIN и IAA.

Според достапната литература, нема резултати од други автори за микропропагација на агератум

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Во оваа истражување беше испитувано вилијанието на одредени концентрации и комбинации на BA, GA₃, IAA и NAA врз органогенезата во *in vitro* услови на меристемските пупки и котиледоните од црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум. Иако методата култура на растителни ткива и органи е релативно нова во современата биотехнологија, своите први фундаментални чекори во развиените научно-истражувачки центри ги направила во средината на овој век. Денес овој метод има огромно апликативно значење во процесот на производството на здрави и квалитетни сорти и хибриди од декоративни видови. Во Република Македонија оваа метода почнала да се користи во последните петнаесеттина години.

Како резултат на тоа, основна цел на нашите испитувања беше да се постави култура од меристемските пупки и котиледоните од црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум да се запознаат својствата на ткивата *in vitro*, пред сè нивниот потенцијал за микропропагација и регенерација во растение, потоа да се добијат сознанија за нивна способност за аклиматизација во надворешни услови, како би се овозможило интензивирање на производство на посадочен материјал и добивање на здрави растенија.

Овие испитувања се основа за понатамошни истражувања за подобрување на регенерацијата на различни почетни експлантанти од црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум во цели регенерирани растенија.

Целокупната лабораториска работа во ова истражување е изведувана на Катедрата за растителна биотехнологија при Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип, во Лабораторијата за растителна биотехнологија, која е лоцирана во Наставниот центар - Струмица.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Истражувањата опишани во овој труд беа спроведени на Катедрата за растителна биотехнологија, Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“- Штип, во Наставен центар Струмица. Како почетен експериментален материјал за *in vitro* пропaгација беа користени меристемски (апикални) пупки од комерцијално достапни генотипови на црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум.

4.1. Стерилизација на семето

Семето од четрите истражувани видови најпрво беше измиено со дестилирана вода, потоа површински стерилизирано со потопување во 70% етанол C_2H_5OH за време од 3 минути, потопено во 1,5% Izosan G за време од 10 минути, а потоа истото беше три пати промиено со стерилна дестилирана вода.

Вака стерилизираното семе беше поставено на 1/2 MS (Murashige & Skoog, 1962) минерален раствор на 'ртење. Кога младите изданоци достигнуваа големина од 3-5 cm (по 21-25 дена), од нив беа изолирани почетните експлантати и истите беа поставени на MS хормонален медиум.

Како почетни експлантати беа користени:

- апикални пупки со големина 1-3 mm,
- котиледони со големина 3-5 mm.

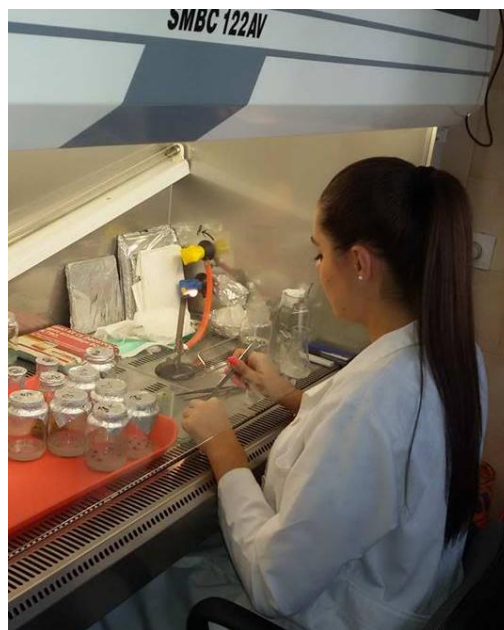
4.2. Стерелизација на хранлива подлога

Сите користени хранливи подлоги беа стерилизирани со автоклавирање на температура од 121°C со притисок од 121,59 kPa за време од 15-20 минути (Слика 14).

Сите манипулации со експлантантите, стерилизацијата на семето, како и добивање на меристеми и котиледони беа изведувани во стерилни услови во ламинарна комора (Слика 15).



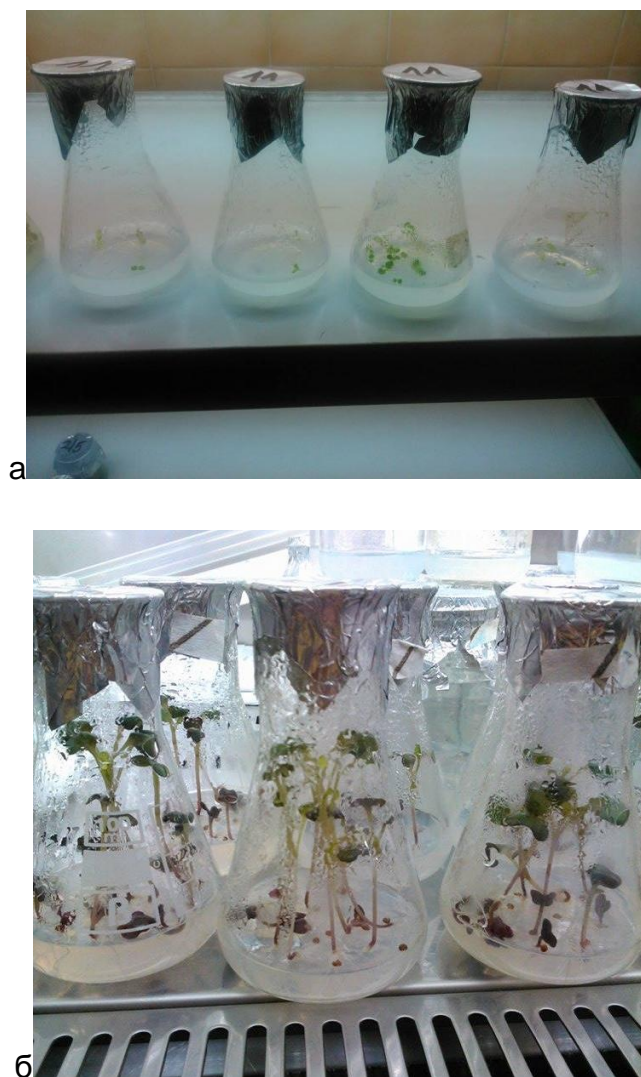
Слика 14. Стерилизација на хранливите подлоги и стакларијата во автоклав
Figure 14. Sterilization of media and glassware in autoclave



Слика 15. Работа на ламинарна комора на Катедрата за растителна биотехнологија, Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“- Штип, во Наставен центар Струмица.
Figure 15. Work on a laminar flow hood in the Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture at the "Goce Delcev" University - Stip, at Strumica.

4.3. Добивање на почетен материјал за микропропагација

Семето од комерцијалните генотипови на црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум е поставувано на 1/2MS (Murashige & Skoog, 1962) базален медиум за 'ртење по 10 семки во 10 елермаерки вкупно, или вкупно по 100 семки од секој вид.



Слика 16. а) Поставување на семе за 'ртење на базален медиум, б) Целосно изртено семе, пред изолација на почетните експлантати (Велешанова и сор., 2018)

Figure 16. a) Seed inoculation for sprouting on a basal medium, b) Fully germinated, prior to the isolation of the initial explants (Velesanova et al., 2018)

По поникнувањето на семето, од нукулците беа издвоени мерситемски пупки со големина 1-3 mm и котиледони со големина од 1-3 mm, 1/3 дел од котиледони со големина 3-5 mm, кои беа користени како почетен материјал (почетни експлантанти) за експериментот.

4.4. Состав на MS подлогата за култивирање на експлантатите

Во овие истражувања беше користен MS медиумот чиј состав на минерален раствор (Murashige & Skoog, 1962) е даден во табелата број 3.

Табела 3. Состав на MS медиумот (Murashige & Skoog, 1962)

Table 3. Composition of MS medium (Murashige & Skoog, 1962)

соединение	концентрација
Na ₂ EDTA	33,30 mg/l
MgSO ₄ x7H ₂ O	370,00 mg/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440,00 mg/l
KH ₂ PO ₄	170,00 mg/l
KNO ₃	1900,00 mg/l
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg/l
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,80 mg/l
H ₃ BO ₃	6,20 mg/l
MnSO ₄ x4H ₂ O	22,30 mg/l
ZnSO ₄ x4H ₂ O	8,60 mg/l
KJ	0,80 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,20 mg/l
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025 mg/l
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025 mg/l

Во хранливата подлога беа додадени следните органски компоненти:

Витамин В6 (пиридоксин).....1,0 mg/l
Витамин В1 (тиамин)0,1 mg/l
Сахароза.....30,0%
Казеин хидролизат.....200,0 g/l

Никотинска киселина.....0,5 mg/l
Инозитол.....100,0 g/l
Агар-агар.....7,0%

Хранливиот медиум беше збогатен со различни комбинации на фитохормони и тоа:

Хранлива подлога А: MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃

Хранлива подлога В: MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA

Хранлива подлога С: MS + 2 mg/l BA

Хранлива подлога D: MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA

Хранлива подлога E: MS + 5 mg/l BAP

Хранлива подлога F: MS + 3 mg/l BA + 1,5 mg/l NAA

4.5. Услови за одгледување на културите

Меристемите и котиледоните беа култивирани во стаклени теглички во 20-30 ml хранлива подлога. Поставените култури беа чувани во контролирани услови клима-комори и тоа: температура од 25°C; релативна влажност на воздухот од 50%; фотопериодизам од 16 часа светло / 8 часа темно и интензитет на светлина од 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Чувањето на културите на контролирани услови во клима-комора е прикажано на (Слика 17).



Слика 17. Чување на културите во клима-комора
Figure 17. Storage of cultures in climate chamber

4.6. Спектрофотометриско одредување на фотосинтетски пигменти

4.6.1. Постапка за екстракција

Екстракцијата е постапка при која со помош на некој погоден растворувач некоја супстанција се издвојува од раствор или од смеса на цврсти супстанции врз основа на нејзината различна растворливост во нив. Течните фази најчесто се вода, или воден раствор, и органски растворувач. Лабораториската техника е позната како течно-течна екстракција или само екстракција. Ако станува збор за екстракција од цврста фаза, тогаш таа е позната како цврсто-течна екстракција (Мојсов, 2013).

Во најголем број случаи екстракцијата во органска лабораторија најчесто се применува при пречистување и издвојување на супстанциите од нивните реакциони смеси или од природните материи, како и за отстранување на растворни нечистотии од сурови продукти. Без разлика за каков тип на екстракција станува збор, водата речиси секогаш е еден од растворувачите, а другиот е органски растворувач. Изборот на органски растворувачи е доста голем.

Органскиот растворувач кој се користи за екстракција потребно е да ги задоволува следните услови:

- добро да ја раствора супстанцијата;
- да не се меша со вода;
- да има различна густина од водата;
- да е хемиски стабилен (инертен кон присутните супстанции);
- да е лесно испарлив (ниска точка на вриење) за да може лесно да се отстрани од органското соединение;
- да е нетоксичен, незапалив, неотровен и евтин (Мојсов, 2013).

Во текот на истражувањато беше одредувана содржината на хлорофил и каротеноиди во растителен материјал од *in vivo* и *in vitro* услови со примена на UV/VIS спектрофотометриски метод.

Од *in vivo* услови беше земен растителен материјал од листови на четири видови на цвеќе одгледувани во оранжериски услови и тоа: црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум. Содржината на фотосинтетските пигменти од *in vivo* услови беше одредувана во две фенофази и тоа во фаза на никнење и цветање.

Од *in vitro* услови содржината на хлорофил и каротеноиди беше одредувана во култура на изданоци. Содржината на фотосинтетските пигменти од *in vitro* услови беше одредувана во култура на изданоци, добиена од меристемски експлантати, и тоа после 30 и 60 дена од нивното поставување на хормонален медиум како почетен експлантат.

Од сите растителни видови и во двата типа на одгледување од *in vitro* и од *in vivo* услови беа земени по три листови и од секое ливче се отсекуваат рабовите и се зема материјал околу 200 mg или 0,2 g. Земениот материјал од ливчињата се мацерира во аванче со 25 ml 96% етанол C_2H_5OH . Откако ќе се измацерираат добиената течност се ставаат во тиквичка од 25 ml и се дополнува со етанол до маркицата. Потоа со помош на водена вакуум филтрација се екстрахира течността.

Со употребата на вакуум се забрзува филтрирањето, а и речиси целосно се отстранува матичната база. На бихнеровата инка се става филтерна хартија која треба да ја покрива целата перфорација и со помош на гумено црево или затворац се става на вакуум-цицалка (Слика 18). Вакуумот што се создава во садот го повлекува филтратот, па филтрацијата е забрзана. Филтрацијата се прекинува со изедначување на притисокот во садот со надворешниот притисок. Се вади цревото од садот, па се запира водата во вакум-цицалката (Мојсов, 2013).



Слика 18. Водена вакуум филтрација на фотосинтетски пигменти во етанолен раствор

Figure 18. Water vacuum filtration of photosynthetic pigments in ethanolic solution

Етанолните екстракти на фотосинтетските пигменти се префрлаат во кивети, а понатаму следи мерењето на спектрофотометар.

4.6.2. Постапка за квантитативно одредување на содржината на хлорофил и каротеноиди

По извршената етанолна екстракција на фотосинтетските пигменти, пробите беа прфрлувани во кивети за одрадување на апсорпцијата на спектрофотометар. Анализите беа изведувани на UV/VIS спектрофотометар тип JANWAY 6305.

Апаратот треба да се баждира со слепа проба (кивета со 96% етанол), потоа се анализираат и пробите.

Апсорбанцата на вкупниот хлорофил и каротеноидите беше мерена спектрофотометриски на бранова должина од:

- Хлорофил а на бранова должина 665 nm,
- Хлорофил b на бранова должина 649 nm,
- Каротеноиди на бранова должина 470 nm.



Слика 19. Спектрофотометар на кој беа мерени пробите за одредување на хлорофил а, b, и каротеноиди
 Figure 19. Spectrophotometer on which samples were measured for the determination of chlorophyll a, b and carotenoids

Пресметката на анализираниите фотосинтетски пигменти е извшена со следните формули (Sumanta, 2014):

$$\text{Ch a} = 13,7 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649}$$

$$\text{Ch b} = 25,8 \times A_{649} - 7,6 \times A_{665}$$

$$\text{Ch a+b} = 6,1 \times A_{665} + 20,04 \times A_{649}$$

$$\text{Car} = (1000 \times A_{470} - 2,13 \text{ Ch a}) - (97,64 \times \text{Ch b}) / 209$$

4.7. Статистичка обработка на податоци

Сите резултати добиени во текот на ова истражување беа статистички обработени и анализирани со статистичкиот софтвер IBM SPSS Statistics 21 (Statistical Package for the Social Sciences). Добиените средни вредности за различните испитувани параметри беа споредени со One-way ANOVA (Duncan posthoc) тест со ниво на сигнификантност од 0,05%.

5. РЕЗУЛТАТИ

Сите иницијални експлантати, меристемски пупки и котиледони, беа изолирани од семиња кои 'ртат во асептички услови, а потоа истите беа поставени на MS медиум, збогатен со различни концентрации и комбинации на растителни хормони, на кој беше следена способноста за регенерација.

Регулаторите на раст влијаат на способноста на едно ткиво да одговори на понатамошните развојни сигнали (Christiansonet et al., 1985). Многу често клетките реагираат различно во различни развојни фази, при што може да се појави и интеракција помеѓу сигналните патеки на ауксин и цитокини (Strabala et al., 1994). Во табелите и сликите од оваа поглавје презентирани се резултатите од влијанието на различни комбинации и концентрации на хормони за раст врз ефектот на микропропагацијата кај декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум во *in vitro* услови.

5.1. Култивирање на меристеми и котиледони и нивна регенерација по 30 и 60 дена

Меристемските пупки и котиледоните од декоративна зелка, петунија, каранфил и агетарум беа поставени на MS (Murashige & Skoog, 1962) медиум, со одредени концентрации на BA, GA₃, IAA и NAA, каде беше следен нивниот развој со бележење на настанатите промени во развојот на почетните експлантати. Меристемските пупки и котиледоните беа отстранувани од стерилно изртените семиња и како такви претставуваат почетни експлантанти за поставување на клуптури *in vitro*. Меристемските пупки и котиледоните се основата на поставените истражувања од каде се почнува целосниот пристап на овие магистерски тези.

MS медумот беше збогатен со регулатори на раст додадени во соодветни концентрации и комбинации во следните хормонални медиуми:

А хранлива подлога: MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃,

В хранлива подлога: MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA,

С хранлива подлога: MS + 2 mg/l BA,

D хранлива подлога: MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA,

E хранлива подлога: MS + 5 mg/l BAP,

F хранлива подлога: MS + 3 mg/l BA + 1,5 mg/l NAA.

5.2. Култура на меристеми како почетни експлантати

На следните табели и слики се презентирани резултатите од влијанието на различни комбинации и концентрации на хормони за раст и врз микропропагацијата на црвена декоративна зелка, агератум, петунија и каранфил во *in vitro* услови.

5.2.1. Црвена декоративна зелка - *Brassica oleracea* (*Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given*)

Резултатите од формирањето на изданоци од меристеми, како почетни експлантати, на MS медиумите A, B, C и D по 30 дена од црвена декоративна зелка *Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given* прикажани се во Табела 4.

Табела 4. Формирање на изданоци кај меристемски почетните експлантанти од црвена декоративна зелка *Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given* по 30 дена
Table 4. Shoot formation from initial meristematic explants from red decorative cabbage *Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given* after 30 days

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум/ MS medium (mg/L)	Број на експлантати / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Lentgh (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Lentgh (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	40	35c	88a	18	0,41 c	1,90a	70
B	40	47b	92a	26	0,31 b	2,50a	65
C	31	11,5a	38b	21	0,44 c	2,50a	70
D	50	28c	95a	32	1,30 a	2,07a	64

На подлогата A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 40 меристемски пупки со просечна ширина од 35 mm и просечна висина од 88 mm.

На подлогата B MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA беа поставени 40 меристемски пупки со ширина од 47 mm.

На подлогата C MS + 2 mg/l BA беа поставени 31 меристемски пупки со просечна ширина 11,5 mm и просечна висина од 38 mm.

На подлогата D MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 50 меристемски пупки со просечна ширина 28 mm и просечна висина од 95 mm.

Во Табела 4 и на Сликите 20 и 21, исто така се претставени ефектите на MS подлогата, обогатена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст, врз почетните експлантанти од мерсистемски пупки.



Слика 20. Формиран изданок од црвена декоративна зелка по 30 дена од почетното поставување (фотографија Велешанова, 2017)
Figure 20. Developend shoot of decorative red cabbage after a 30 day from the initial setting (photo Velesanova, 2017)



Слика 21. Формиран изданок од калус кај црвена декоративна зелка
Figure 21. Developed shoot by regenerative callus in *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given

5.2.2. Петунија *Petunia* sp.

Резултатите од формирањето на изданоци и лисни розети од меристеми, како почетни експлантати, на MS медиумите А, В, С и D по 30 и 60 дена од петунија *Petunia* прикажани се во Табели 5 и 6.

Табела 5. Формирање на изданок и лисна розета кај почетните експлантанти по 30 дена

Table 5 . Formation of an shoot and a leaf rosette from initial explants after 30 days

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданок и лисна розета / Formation of shoot and a leaf rosette			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	14	0,48 a	0,5 a	14	1,20 a	1,9 a b	100
B	14	0,39 a	0,39 a b	8	1,38 a	1,25 b	57
C	24	0,17 b	0,22 b c	20	1,3 a	2,15 a	83
D	24	0,21 b	0,16 c	/	/	/	/

На подлогата A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 14 меристемски пупки од петунија со просечна ширина од 0,48 cm и просечна висина од 0,5 cm.

На подлогата B MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 14 меристемски пупки со ширина од 0,39 cm и висина од 0,38 cm.

На подлогата C MS + 2 mg/l BA беа поставени 24 меристемски пупки од петунија со просечна ширина 0,16 cm и просечна висина од 0,22 cm.

На подлогата D MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 24 меристемски пупки од петунија со просечна ширина 0,21 cm и просечна висина од 0,16 cm.

Во Табела 5, исто така, се претставени ефектите на MS подлогите обогатени со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од меристемски пупки. На Слика 22 се претставни лисни розети формирани од меристемска пупка кај петунија.



Слика 22. Новоформирани лисни розети од меристемска пупка кај петунија поставена на MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA
Figure 22. Newly formed leaf rosettes from meristem bud of petunia cultivated on MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA



Слика 23. а) Лисна розета од петунија, б) поделена лисна розета на поголем број изданоци кои потоа се пасажирани на подлога за вкоренување MS + 0,5 mg/l IAA+2,5 mg/l IBA (Велешанова и соп.,2016)

Figure 23. a) Leaf rosette from *petunia*, b) divided the leaf rosette of a larger number of sperm cells, which are then deposited on the root base MS + 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l IBA (Velesanova et al., 2016)

Формираните лисни розети (Слика 23, а) содржат голем број изданоци кои беа соодветно поделени на единечни изданоци (Слика 23, б) и истите беа поставени на медиум за вкоренување MS + 0,5 mg/l IAA+2,5 mg/l IBA (Velesanova et al.,2016).

Табела 6. Формирање на изданок и лисна розета кај почетните експлантанти по 60 дена

Table 6 . Shoot formation and leaf rosette from initial explants after 60 days

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданок и лисна розета / Formation of shoot and a leaf rosette			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Бр. на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	14	0,48 a	0,5 a	19	0,98 a	2,5 a	135
B	14	0,39 a	0,39 a b	5	1a	2,45 a	35,7
C	24	0,17 b	0,22 b c	15	1,35 a	2,47 a	62
D	24	0,21 b	0,16 c	/	/	/	/

5.2.3. Каранфил (*Dianthus* sp.)

Резултатите од формирањето на изданоци од меристеми, како почетни експлантати, на MS медиумите A, B, C и D по 30 и 60 дена од каранфил *Dianthus* sp. прикажани се во Табели 7 и 8.

Табела 7. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти по 30 дена
Table 7. Shoot formation from initial explants after 30 days

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	34	0,25 b	1,14 a	23	0,41 b	3,97 a	67
B	34	0,33 a	1,19 a	37	0,27 b	4,03 a	108
C	38	0,25 b	1,01 a	31	1,21 a	3,58 a	81
D	41	0,25 b	1,01 a	33	1,30 a	3,93 a	80

На подлога A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 34 меристемски пупки од каранфил со просечна ширина од 0,25 cm и просечна висина од 1,14 cm.

На подлога B MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 34 меристемски пупки со ширина од 0,33 cm и висина од 1,18 cm.

На подлога C MS + 2 mg/l BA беа поставени 38 меристемски пупки од петунија со просечна ширина 0,24 cm и просечна висина од 1 cm.

На подлога D MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 41 меристемски пупки од петунија со просечна ширина 0,25 cm и просечна висина од 1 cm.

Во Табела 6, исто така, се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од мерсистемски пупки. На Слика 24 е преставен

формирн изданок од каранфил (а) и негово пренесување на хранлив медиум за вкоренување (б).



Слика 24. а) Изданок од каранфил б) пренесување на изданок на медиум за вкоренување MS + 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l IBA (фотографија Велешанова, 2016).

Figure 24. a) Release of top carnation b) transferred to rooting medium with MS + 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l IBA (photo Velesanova, 2016).

Табела 8. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти по 60 дена
Table 8. Shoot formation from initial explants after 60 days

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	на % формирање на изданоци / % of forming shoots
A	34	0,25 b	1,14 a	13	1,61 a	4,58 a	85
B	34	0,33 a	1,19 a	26	0,61 b	4,20 a b	76
C	38	0,25 b	1,01 a	39	1,30 a	3,33 b	102
D	41	0,25 b	1,01 a	24	1,67 a	4,33 a b	58

5.2.4. Агератум (*Ageratum* sp.)

Резултатите од формирањето на изданоци од меристеми, како почетни експлантати, на MS медиумите А, В, Е и F по 30 дена од агератум *Ageratum* sp. прикажани се во Табела 9.

Табела 9. Формирање на изданок кај почетните експлантанти по 30 дена
Table 9. Shoot formation from initial explants after 30 day.

Почетни експлантанти – меристеми Initial explants – meristem				Формирање на изданок / Formation of shoot			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти/ Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	6	17a	17a	7	1,12ab	1,94a	85
B	6	12a	10a	6	1,20ab	0,96a	100
E	6	13a	12a	2	0,50b	1,00a	16
F	6	17a	18a	4	1,42a	1,75a	83

На подлога А MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 6 меристемски пупки со просечна ширина од 16 mm и просечна висина од 11,6 mm.

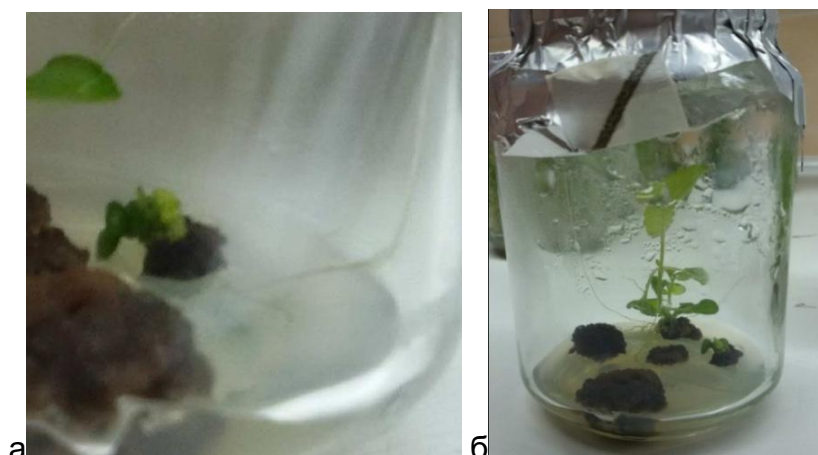
На подлога В MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 6 меристемски пупки со ширина од 1 mm и висина од 10,1 mm.

На подлога Е MS + 5 mg/l BAP беа поставени 6 меристемски пупки со просечна ширина 13 mm и просечна висина од 11 mm.

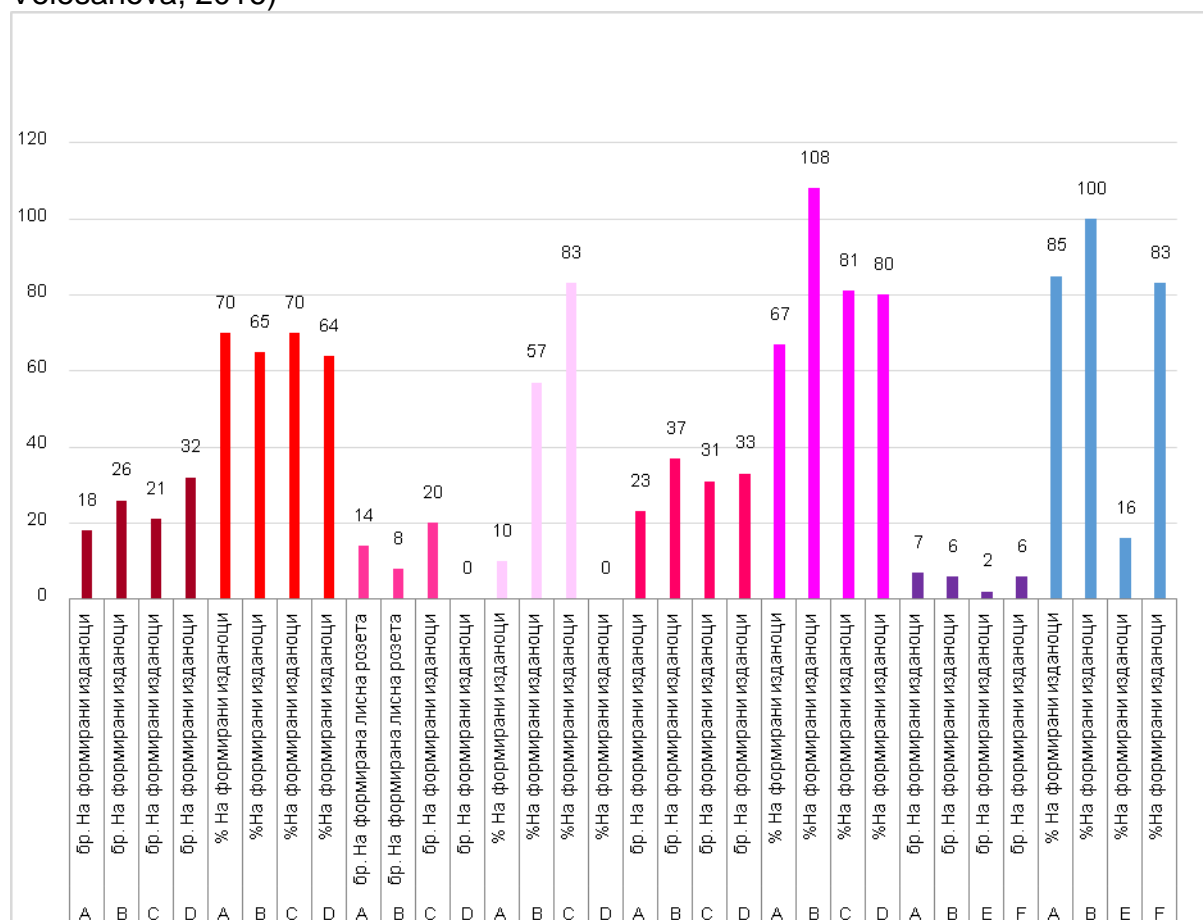
На подлога F MS + 3 mg/l BA + 1,5 mg/l NAA беа поставени 6 меристемски пупки со просечна ширина 16 mm и просечна висина од 18 mm.

Во Табела 9, исто така, се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од меристемски пупки. Од Слика 25 се гледа регенеративен калус (а) и формиран изданок од калус, додека на Слика 26 е

преставен бројот и процентот на формирани изданоци по 30 дена од нивното почетно поставување.



Слика 25. а) Регенеративен калус, б) формиран изданок од калус кај агератум (фотографија Велешанова, 2016)
Fig 25. a) Regenerative callus, b) shoot formation by callus in ageratum (photo Velesanova, 2016)



Слика 26. Број на формирани изданоци и нивен процент по 30 дена
Figure 26. Number of formed shoot and their percentage after 30 days

5.3. Култура на котиледони како почетни експлантанти

5.3.1. Црвена декоративна зелка - (*Brassica oleracea* cv. Kyoto red given)

Резултатите од формирањето на изданоци од котиледони, како почетни експлантанти, на MS медиумите А, В, С и D по 30 дена од црвена декоративна зелка *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given прикажани се во Табела 10.

Табела 10. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти по 30 дена
Table 10. Shoot formation from initial explants after 30 day

Почетни експлантанти – котиледони Initial explants – cotyledons				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантант и / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	48	1,27 a	0,25 a	18	1 b	0,6 a	37,5
B	55	1,09 b	0,21 a b	31	1,10 b	0,7 a	56
C	47	0,32 c	0,14 b	30	1,08 b	0,23 b	64,8
D	50	1,01 b	0,16 b	/	/	/	/

На подлогата А MS+ 2 mg/l BA +0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 48 котиледони со просечна ширина 12,7 mm и висина 25 mm.

На подлогата Б MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 55 котиледони со просечна ширина 10,9 mm и висина 21 mm.

На подлогата С MS + 2 mg/l BA беа поставени 47 котиледони со просечна ширина 32 mm и просечна висина 14 mm.

На подлогата D MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 50 котиледони со просечна ширина 10,1mm и просечна висина 16 mm.

Регулаторите на раст влијаат на способноста на едно ткиво да одговора на понатамошните развојни сигнали. Многу често клетките реагираат различно

во различни развојни фази, при што може да се појави и интеркација помеѓу сигналните патеки на ауксин и цитокини.

Во Табела 10, исто така, се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од котиледони (Слика 27).



Слика 27. Изданок формиран од котиледони на црвена декоративна зелка (фотографија Велешанова, 2017)

Figure 27. Shoot formation cotyledons from *Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given* (photo Velesanova 2017).

5.3.2. Петунија (*Petunia* sp.)

Резултатите од формирањето на изданоци и лисни розети од котиледони, како почетни експлантати, на MS медиумите А, В, С и D по 30 дена од петунија *Petunia* sp. прикажани се во Табела 11 и Слика 28.

Табела 11. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти по 30 дена
Table 11. Shoot formation from initial explants after 30 day

Почетни експлантанти – котиледони Initial explants – cotyledons				Формирање на изданок и лисна розета / Formation of shoot and a leaf rosette			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлант и / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	%на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	14	0,48 a	0,5 a	16	0,98 a	0,35a	87.5
B	14	0,39 a	0,39 a b	22	0,21 b	0,14 b	63.7
C	24	0,17 b	0,22 b c	/	/	/	/
D	24	0,21 b	0,16 c	/	/	/	/

На подлогата A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 14 котиледони со просечна ширина 0,48 mm и висина 0,5 mm.

На подлогата B MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 14 котиледони со просечна ширина 0,39 mm и висина 0,39 mm.

На подлогата C MS + 2 mg/l BA беа поставени 24 котиледони со просечна ширина 0,17 mm и просечна висина 0,22 mm,

Наподлогата DMS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 24 котиледони со просечна ширина 0,21 mm и просечна висина 0,16 mm.

Во Табела 11 исто така се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од котиледони.



Слика 28. Лисна розета од котиледони на петунија (фотографија Велешанова, 2016)

Picture 28. Leave rosette from the cotyledonson *Petunia* sp. (photo Velesanova, 2016)

5.3.3. Каранфил (*Dianthus* sp.)

Резултатите од формирањето на изданоци од котиледони, како почетни експлантати, на MS медиумите A, B, C и D по 30 дена од каранфил *Dianthus* sp. прикажани се во Табела 12.

Табела 12. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти по 30 дена
Table 12. Shoot formation from initial explants after 30 day

Почетни експлантанти – котиледони Initial explants – cotyledons				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Length (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	32	1,14 a	0,21 b	/	/	/	/
B	32	1,02 a	0,19 b	/	/	/	/
C	74	0,70 b	0,27 a	/	/	/	/
D	68	0,25 c	0,23 a b	/	/	/	/

На подлогата A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 32 котиледони со просечна ширина 1,14 mm и висина 0,21 mm.

На подлогата B MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA беа поставени 32 котиледони со просечна ширина 1,02 mm и висина 0,19 mm.

На подлогата C MS + 2 mg/l BA беа поставени 74 котиледони со просечна ширина 0,7 mm и просечна висина 0,27 mm.

На подлогата D MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA беа поставени 68 котиледони со просечна ширина 0,25 mm и просечна висина 0,23 mm.

Во Табела 12 исто така се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од котиледони.

5.3.4. Агератум (*Ageratum sp.*)

Резултатите од формирањето на изданоци од котиледони, како почетни експлантанти, на MS медиумите A, B, E и F по 30 дена од агератум *Ageratum sp.* прикажани се во Табела 13.

Табела 13. Формирање на изданоци од котиледони како почетните експлантанти кај агератум по 30 дена
Table 13. Shoot formation of cotyledone from initial explants in agheratum after 30 days

Почетни експлантанти – котиледони Initial explants – cotyledons				Формирање на изданоци / Shoot formation			
MS медиум / MSmedium (mg/L)	Број на експлантанти и /Number of explants	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Lentgh (mm)	Број на изданоци / Number of shoots	Дебелина / Thickness (mm)	Должина / Lentgh (mm)	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
A	12	22a	14a	/	/	/	/
B	12	16a	11a	/	/	/	/
E	12	22a	10a	/	/	/	/
F	12	14a	12a	/	/	/	/

На подлогата A MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ беа поставени 12 котиледони со просечна ширина 22 mm и просечна висина 14 mm.

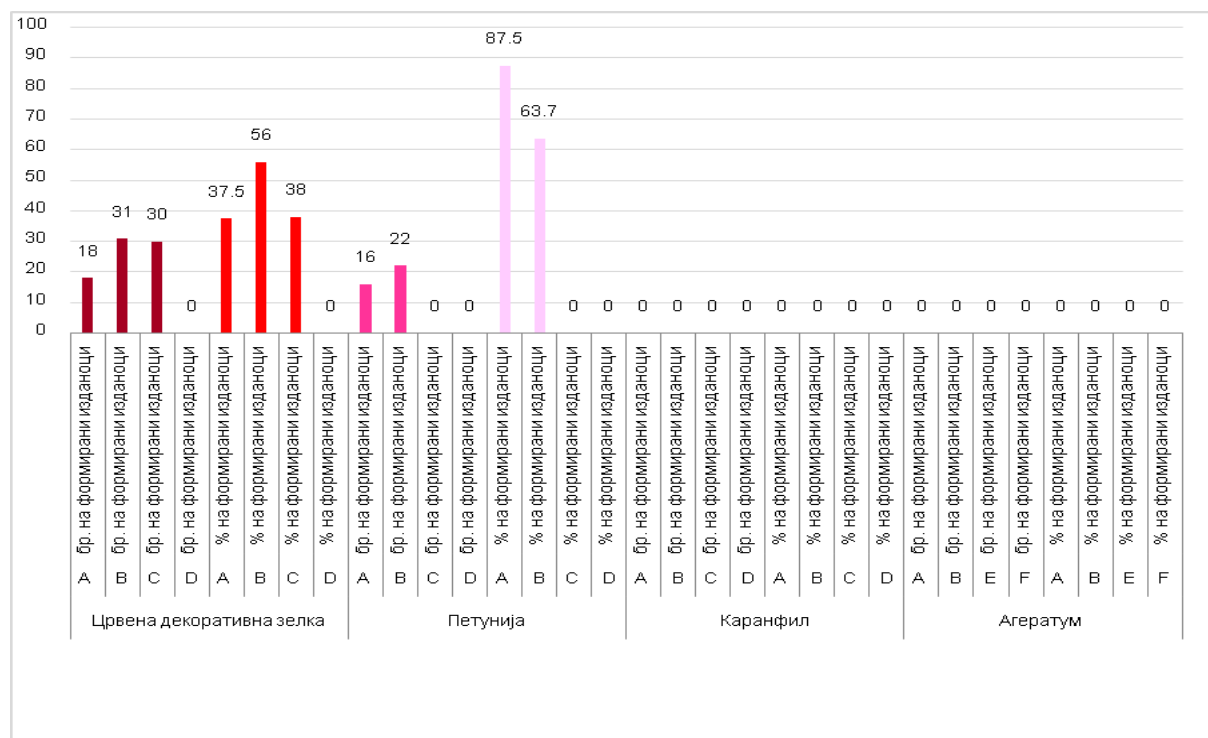
На подлогата B MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA беа поставени 12 котиледони со просечна ширина 16 mm и просечна висина 11 mm.

На подлогата C MS + 5mg/l BAP беа поставени 12 котиледони со просечна ширина 22 mm и просечна висина 10 mm.

На подлогата D MS + 3 mg/l BA + 1,5 mg/l NAA беа поставени 12 котиледони со просечна ширина 14 mm и просечна висина 12 mm.

Во Табела 13 исто така се претставени ефектите на MS подлогата снабдена со различни комбинации и концентрации на регулатори на раст врз почетните експлантанти од котиледони.

На Слика 29 е престаен бројот на формирани изданоци од котиледони како почетен експлантант и нивниот процент кај црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум.

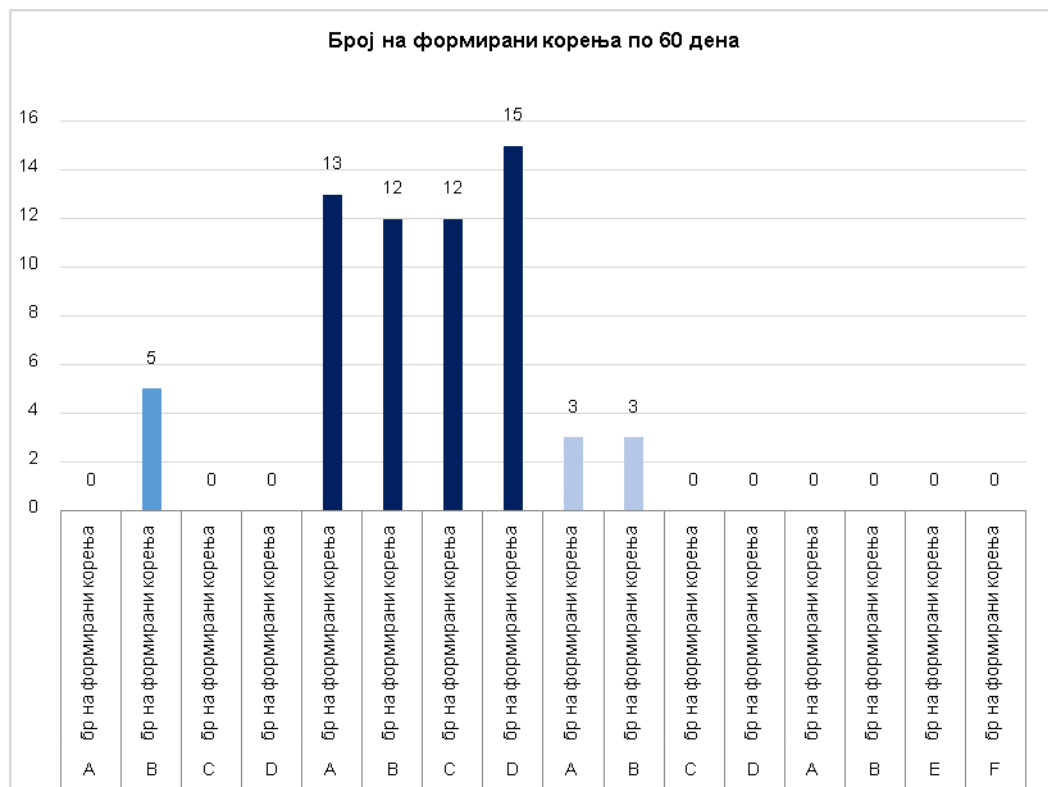


Слика 29. Број на формирани изданоции и котиледони како почетни експлантати кај црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум.
Figure 29. Number of formed shoots of cotyledons as initial explants shoots and their percentage in red decorative cabbage, petunia, carnation and *Ageratum* sp.

5.4. Вкоренување и адаптација на изданоци

Ауксините се фитохормони кои ја индуцираат ризогенезата, без нивно присуство вкоренувањето отсуствува. Помалите концентрации на ауксини во MS медиумот го стимулираат вкоренувањето, а најверојатно ниските вредности на истите во медиумот ја стимулираат ендегенета биосинтеза. Доколку концентрациите на IAA и IBA се повисоки во тој случај процентот на вкоренувањето е значително помал, а се одразува и по бројот на корените по изданок и по нивната должина (Спасеноски и Колева, 1994).

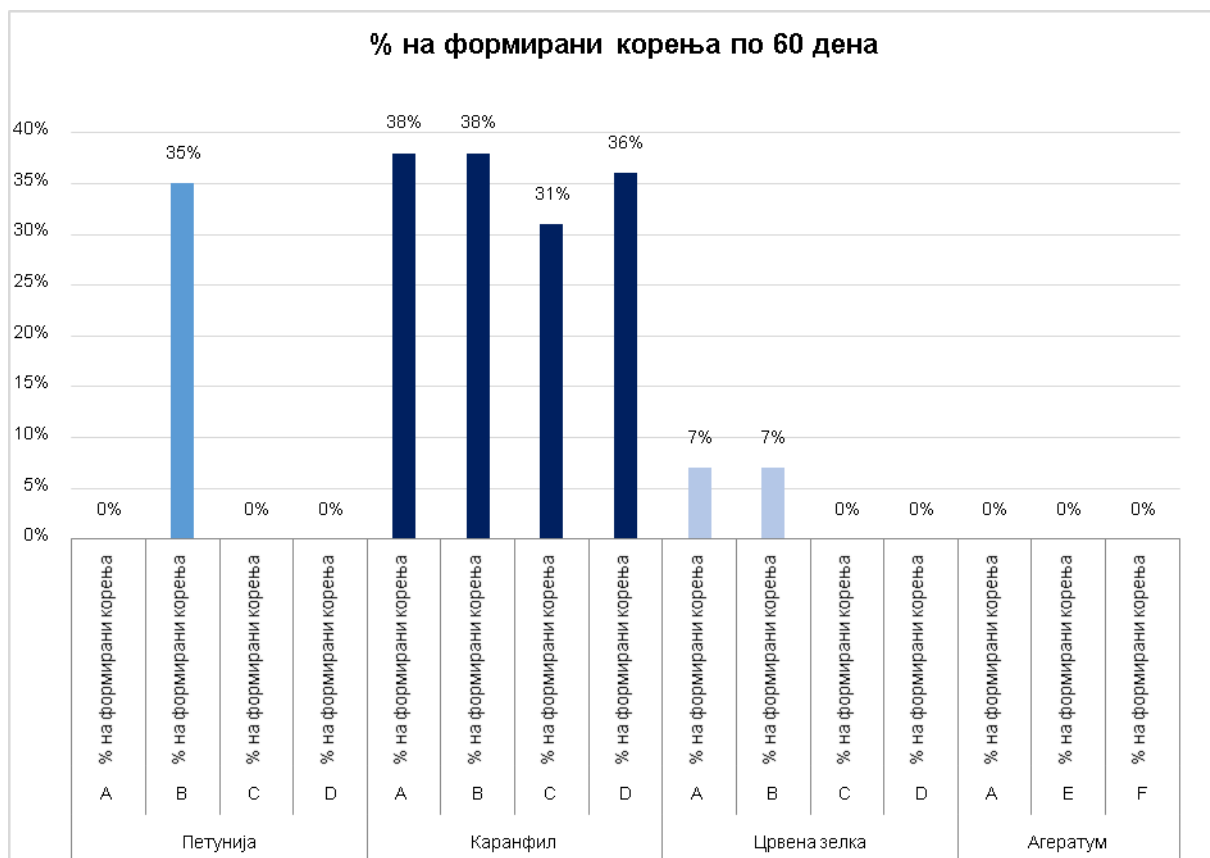
Процентот и бројот на вкоренување во култура на изданоци се прикажани на Сликите 30 и 31 по 60 дена од почетното поставување на меристемските експлантати.



Слика 30. Број на формирани корења по 60 дена од почетното поставување
Figure 30. Number of roots formed after 60 days of the initial setting

После 60 дена беше утврдено кои од комбинациите на регулатори на раст имаат дадено ефект на формирање на корења кај експлантантите од петунија и каранфил (Слика 31). Кај петунија само 5 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA додека останатите три не

образуваа корења. Кај каранфил 13 и 12 формираа корења соодветно, на подлогите MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ и MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA; на подлогата MS + 2 mg/l BA 12 регенеранти формираа корења; и на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA 15 регенеранти формираа исто така корења. Кај црвена декоративна зелка 3 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ и 3 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA додека останатите две не образуваа корења. Кај агератумот регенерантите не формираа корења.

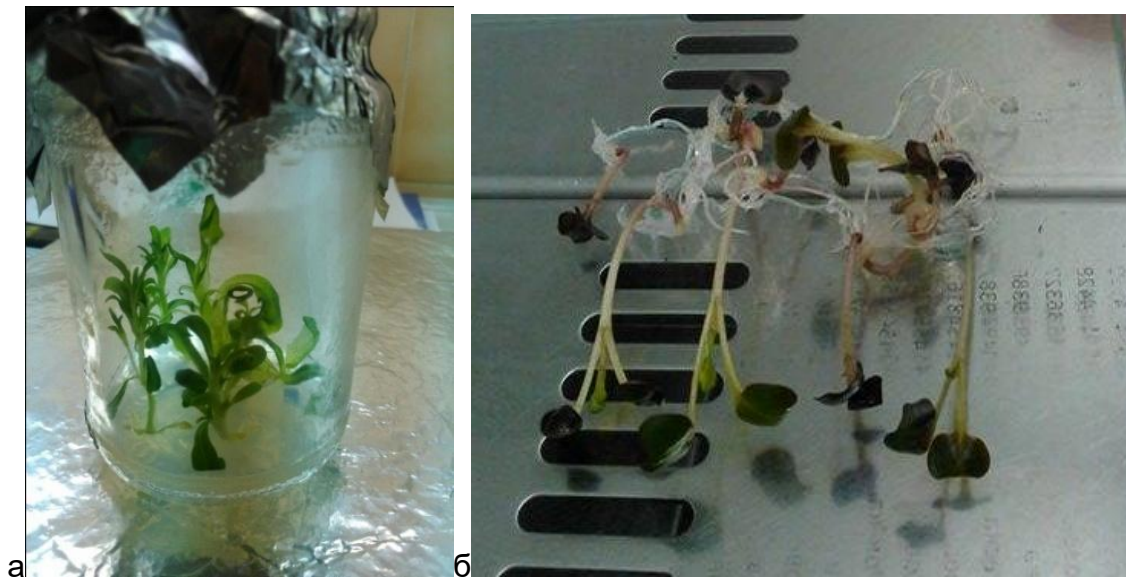


Слика 31. Процент на формирани корења после 60 дена од почетното поставување

Figure 31. Percentage of roots formed after 60 days of initial setting

Од добиените резултати (Слика 31) е очигледно дека процентот на вкоренување се движи од 7% до 38%. Кај процент на формирање на корени има сигнификанти разлики помеѓу видовите. Видовите петунија (35%), каранфил (38%) и црвена зелка (7%) покажаа вредности кои се разликуваат од видот агератум кој покажа (0%) на формирани корени.

Добивање на вкоренети изданоци и котиледони во *in vitro* услови (Слика 32 и 33).



Слика 32. Добивање на вкоренети изданоци во *in vitro* услови а) каранфил, б) декоративна црвена зелка
Figure 32. Obtaining rooted sputum in in vitro conditions a) carnation, b) red cabbage



Слика 33. Вкоренети котиледони кај петунија (фотографија Велешанова, 2018)
Figure 33. Rooted cotyledons in petunia (photo Velesanova, 2018).

5.5.Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофил и каротеноиди) на декоративните видови во *in vitro* и *in vivo* услови

Хлорофилот и каротеноидите беа одредувани во фаза на никнење и во фаза на цвет кај сите испитувани декоративни видови земени од *in vivo* услови. Во *in vitro* услови материјалот за одредување на фотосинтетските пигменти беше земен од култура на изданоци на испитуваните видови и тоа после 30 и 60 денови од поставувањето на културите.

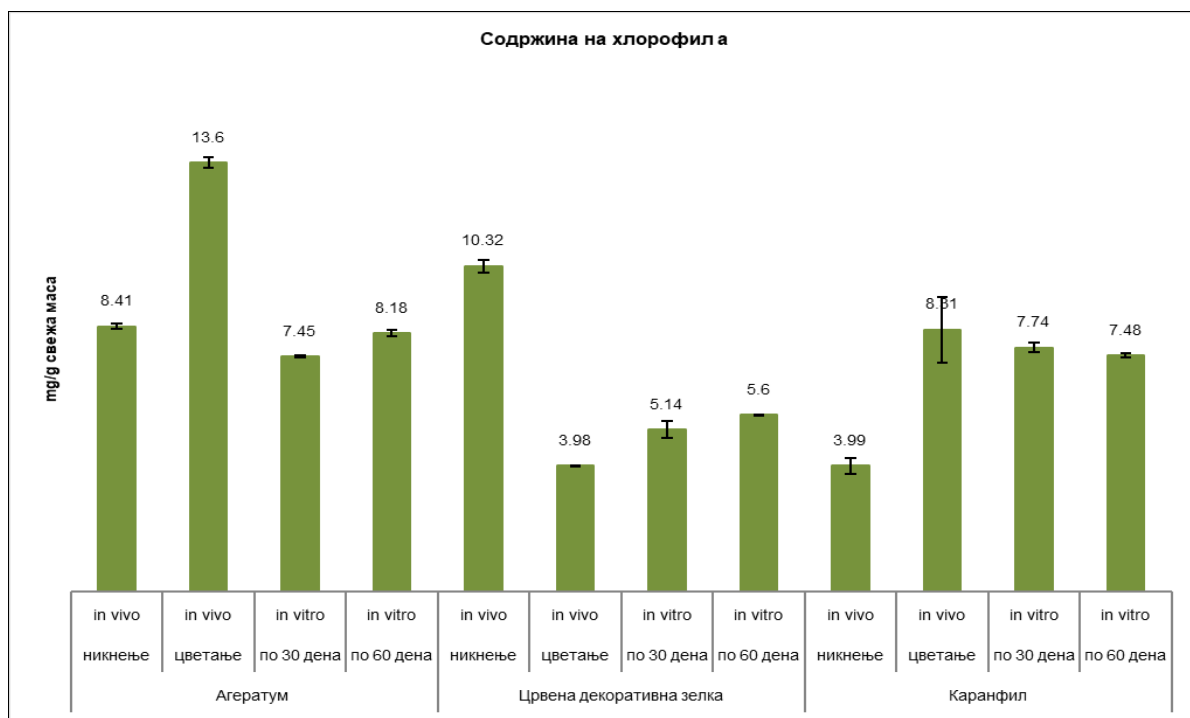
5.5.1. Хлорофил а

Добиените просечните вредности за вкупната содржина на хлорофил а кај истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 14 и на Слика 34.

Табела 14. Просечни вредности за хлорофил а кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 14. Average values for chlorophyll a in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

Вид View	Фаза Phase	Услови Conditions	Средна вредност хлорофил mg/g свежа маса Mean value chlorophyll mg/g fresh mass	Стандардна девијација Standard deviation
Агератум (<i>Ageratum</i> sp. sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	8,41	0,08
	цветање	<i>In vivo</i>	13,6	0,17
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	7,45	0,04
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	8,18	0,10
Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea</i> cv. <i>Kyoto red given</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	10,32	0,20
	цветање	<i>In vivo</i>	3,98	0,03
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	5,14	0,27
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	5,60	0,02
Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	3,99	0,25
	цветање	<i>In vivo</i>	8,31	1,04
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	7,74	0,16
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	7,48	0,06



Слика 34. Просечни вредности за содржина на хлорофил а (mg/g свежа маса) кај различните декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Figure 34. Average values for chlorophyll a content (mg/g fresh weight) in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

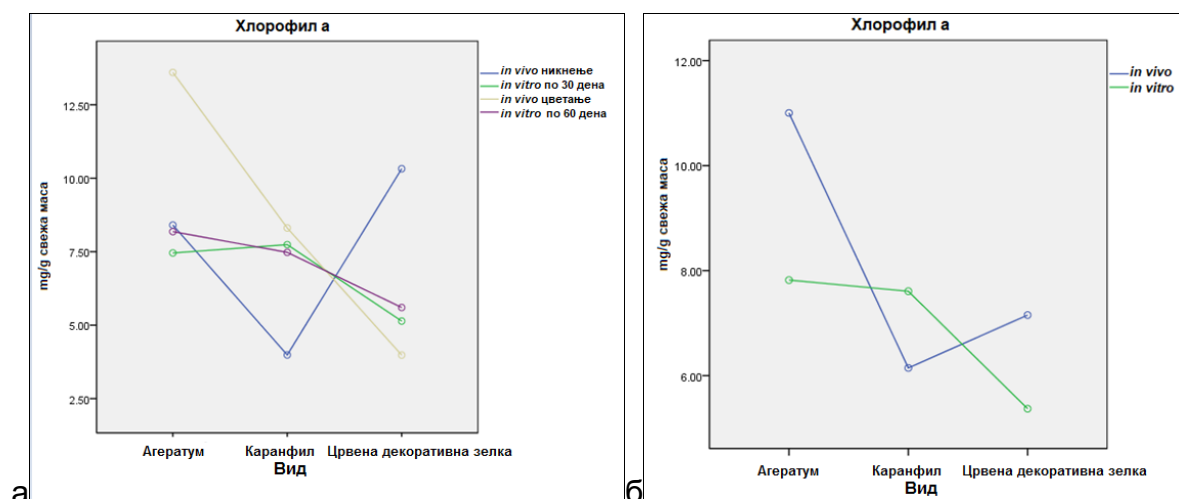
Во Табела 15 претставена е униваријантната анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а во *in vivo* и *in vitro* услови.

На Слика 35 претставена е пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а на испитуваните декоративни видови, слика 35 а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и слика 35 б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови).

Табела 15. Униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 15. Univariate analysis of the influence of different decorative species, treatment and phenophase of the average value of the chlorophyll a content in *in vivo* and *in vitro* conditions

Фактор/ Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Степен на слобода / Degree of freedom (df)	Просек на квадрат / Mean Square	F тест /F test	Фактор / Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Сигнификантност/ Significant	Сила на фактор/ Effect of factor (Partial eta squared)
Вид / Species	66,904	2	33,452	296,704	0,000	0,961	0,000	0,961
Третман и фенофаза / Treatment & phenophase	5,461	2	2,730	24,216	0,000	0,669	0,000	0,669
Вид * третман и фенофаза/ Species * treatment & phenophase	124,494	4	31,124	276,050	0,000	0,979	0,000	0,979
Грешка / Error	2,706	24	0,113					
Вкупно / Total	2280,106	36						
Corrected Total	245,908	35						



Слика 35. Пресметана гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а на испитуваните декоративни видови а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови)

Figure 35. Estimated marginal means chlorophyll a content of the investigated ornamental species grown a) in different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions) and different phenophases and b) for different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions)

Во Табела 16 претставена е компаративната анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил а кај сите испитувани декоративни видови.

Табела 16. Компаративна анализа помеѓу просечната содржина на хлорофила кај различните декоративни видови

Table 16. Comparative analysis between the average content of chlorophyll in different decorative species

Третман(А)/ Treatment (A)	Третман(Б)/ Treatment (B)	(А-Б) Разлика на просечни вредности/ (A-B) Mean difference	Стандардна грешка/ Standard error	Сигнификантност ^c / Significance ^c
<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	1,168 ^{*,a,b}	0,112	0,000
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-1,168 ^{*,a,b}	0,112	0,000

Врз основа на пресмета гранична вредност.

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (А).

b. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (Б).

c. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

a. An estimate of the modified population marginal mean (I).

b. An estimate of the modified population marginal mean (J).

c. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

5.5.2 Хлорофил b

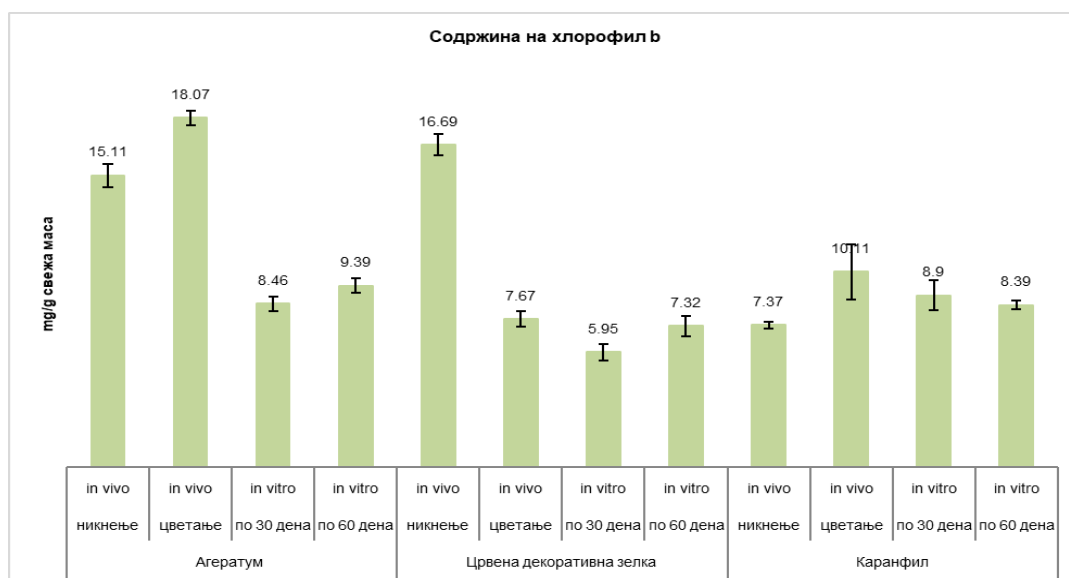
Добиените просечните вредности за вкупната содржина на хлорофил b на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 17.

Просечните вредности за вкупната содржина на хлорофил b на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени исто така и графички на Слика 37.

Табела 17. Просечни вредности за хлорофил b кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 17. Average values for chlorophyll bin different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

Вид View	Фаза Phase	Услови Conditions	Средна вредност хлорофил mg/g свежа маса Mean value chlorophyll mg/g fresh mass	Стандардна девијација Standard deviation
Агератум (<i>Ageratum sp.</i> sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	15,11	0,60
	цветање	<i>In vivo</i>	18,07	0,38
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	8,46	0,39
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	9,39	0,38
Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea cv. Kyoto red given</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	16,69	0,53
	цветање	<i>In vivo</i>	7,67	0,40
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	5,95	0,41
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	7,32	0,53
Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	7,37	0,17
	цветање	<i>In vivo</i>	10,11	1,42
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	8,9	0,78
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	8,39	0,22



Слика 37. Просечни вредности за хлорофил b (mg/g свежа маса) кај различните декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Figure 37. Average values for chlorophyll b (mg/g gresh weight) in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

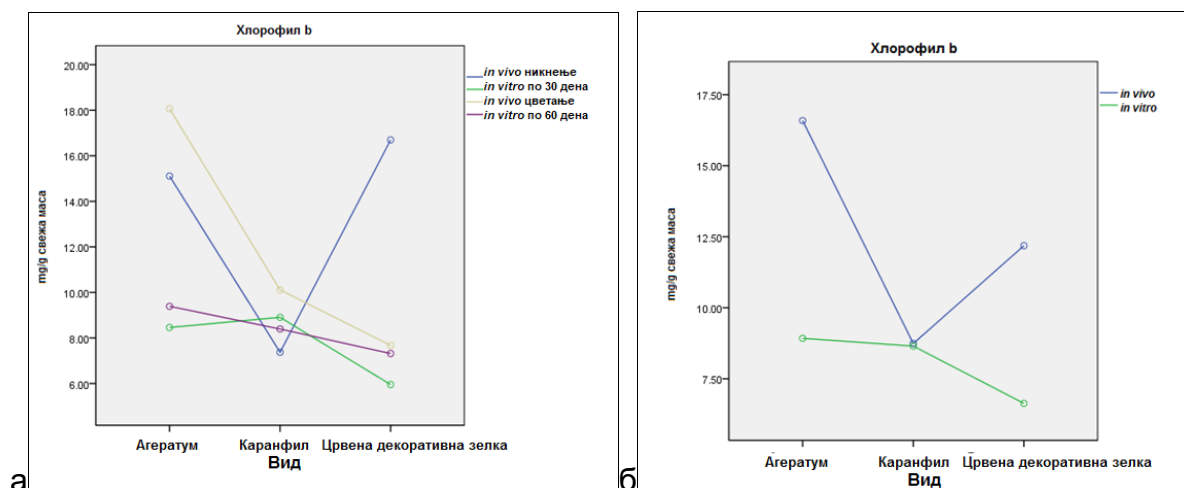
Во Табела 18 претставена е униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил b во *in vivo* и *in vitro* услови.

На Слика 38 претставена е пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил b на испитуваните декоративни видови, слика 38 а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и слика 38 б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови).

Табела 18. Униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 18. Univariate analysis of the influence of different decorative species, treatment and phenophase of the average value of the chlorophyll a content in *in vivo* and *in vitro* conditions.

Фактор/ Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Степен на слобода / Degree of freedom (df)	Просек на квадрат / Mean Square	F тест /F test	Фактор / Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Сигнификантност/ Significant	Сила на фактор/ Effect of factor (Partial eta squared)
Вид / Species	112,827	2	56,414	153,096	0,000	0,927	0,000	0,927
Третман и фенофаза/ Treatment & phenophase	7,127	2	3,564	9,671	0,000	0,446	0,001	0,446
Вид * третман и фенофаза/ Species * treatment & phenophase	143,827	4	35,957	97,579	0,000	0,942	0,000	0,942
Грешка / Error	8,844	24	0,368					
Вкупно / Total	4351,232	36						
Corrected Total	541,207	35						



Слика 38. Пресметана гранична вредност на просечната содржина на хлорофил б на испитуваните декоративни видови а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови)

Figure 38. Estimated marginal means of chlorophyll b content of the investigated ornamental species grown a) in different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions) and different phenophases and b) for different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions)

Во Табела 19 претставена е компаративната анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил, а кај сите испитувани декоративни видови.

Табела 19. Компаративна анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил б кај различните декоративни видови

Table 19. Comparative analysis between the average content of chlorophyll b in different decorative species

Третман(А)/ Treatment (A)	Третман(Б)/ Treatment (B)	(А-Б) Разлика на просечни вредности/ (A-B) Mean difference	Стандардна грешка/ Standard error	Сигнификантност ^c / Significance ^c
<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	4,435 ^{*,a,b}	0,202	0,000
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-4,435 ^{*,a,b}	0,202	0,000

Врз основа на пресмета гранична вредност.

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (А).

b. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (Б).

c. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

a. An estimate of the modified population marginal mean (I).

b. An estimate of the modified population marginal mean (J).

c. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

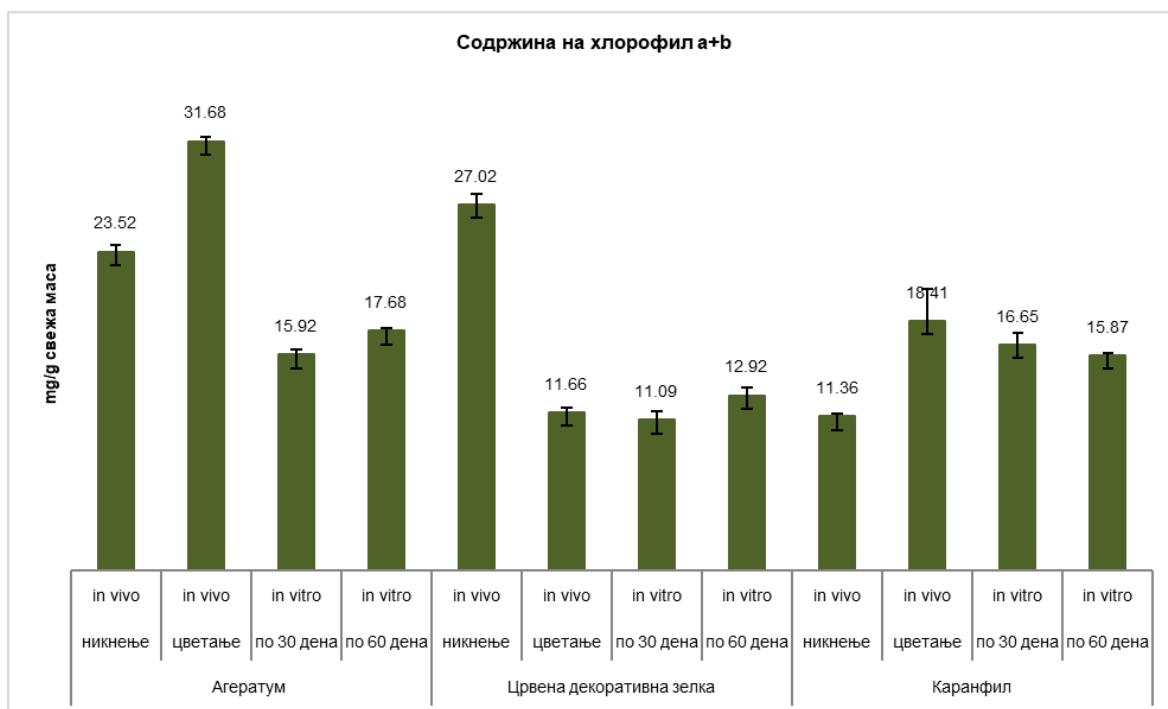
5.5.3. Вкупни хлорофили a+b

Добиените просечните вредности за вкупната содржина на хлорофили a+b на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 20 и Слика 39.

Табела 20. Просечни вредности за вкупни хлорофили a+b кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 20. Average values for total chlorophyll a+b in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

Вид View	Фаза Phase	Услови Conditions	Средна вредност хлорофил mg/g свежа маса Mean value chlorophyll mg/g fresh mass	Стандардна девијација Standard deviation
Агератум (<i>Ageratum sp.</i> <i>sp.</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	23,52	0,52
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	15,92	0,36
	цветање	<i>In vivo</i>	31,68	0,37
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	17,68	0,19
Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea cv. Kyoto red given</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	27,02	0,75
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	11,09	0,62
	цветање	<i>In vivo</i>	11,66	0,36
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	12,92	0,56
Каранфил (<i>Dianthus sp.</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	11,36	0,25
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	16,65	0,88
	цветање	<i>In vivo</i>	18,41	2,39
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	15,87	0,20



Слика 39. Просечни вредности за хлорофил а+b (mg/g свежа маса) кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Figure 39. Average values for chlorophyll a+b in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

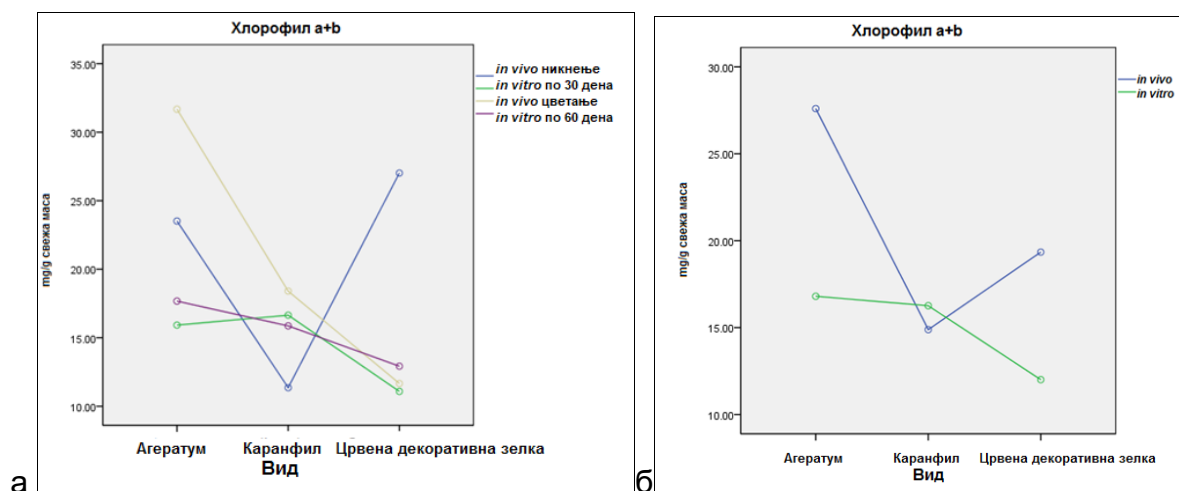
Во Табела 21 претставена е униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а+b во *in vivo* и *in vitro* услови.

На Слика 40 претставена е пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а+b на испитуваните декоративни видови, слика 40 а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и слика 40 б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови).

Табела 21. Униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 21. Univariate analysis of the influence of different decorative species, treatment and phenophase of the average value of the chlorophyll a content in *in vivo* and *in vitro* conditions

Фактор/ Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Степен на слобода / Degree of freedom (df)	Просек на квадрат / Mean Square	F тест /F test	Фактор / Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Сигнификантност/ Significant	Сила на фактор/ Effect of factor (Partial eta squared)
Вид / Species	346,084	2	173,042	242,152	0,000	484,303	0,000	0,953
Третман и фенофаза/ Treatment & phenophase	3,959	2	1,980	2,770	0,000	5,541	0,083	0,188
Вид * третман и фенофаза/ Species * treatment & phenophase	534,727	4	133,682	187,071	0,000	748,286	0,000	0,969
Грешка / Error	17,156	24	0,715					
Вкупно / Total	12842,810	36						
Corrected Total	1418,763	35						



Слика 40. Пресметана гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а+b на испитуваните декоративни видови а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови)

Figure 40. Estimated marginal means chlorophyll a+b content of the investigated ornamental species grown a) in different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions) and different phenophases and b) for different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions)

Во Табела 22 претставена е компаративната анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил а+b кај сите испитувани декоративни видови.

Табела 22. Компаративна анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил а+b кај различните декоративни видови

Table 22. Comparative analysis between the average content of chlorophyll a+b in different decorative species

Третман(А)/ Treatment (A)	Третман(Б)/ Treatment (B)	(А-Б) Разлика на про- сечни вреднос- ти/ (A-B) Mean difference	Стандардна грешка/ Standard error	Сигнификантност ^c / Significance ^c
<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	5,587 ^{*,a,b}	0,282	0,000
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-5,587 ^{*,a,b}	0,282	0,000

Врз основа на пресмета гранична вредност.

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (А).

b. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (Б).

c. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

a. An estimate of the modified population marginal mean (I).

b. An estimate of the modified population marginal mean (J).

c. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

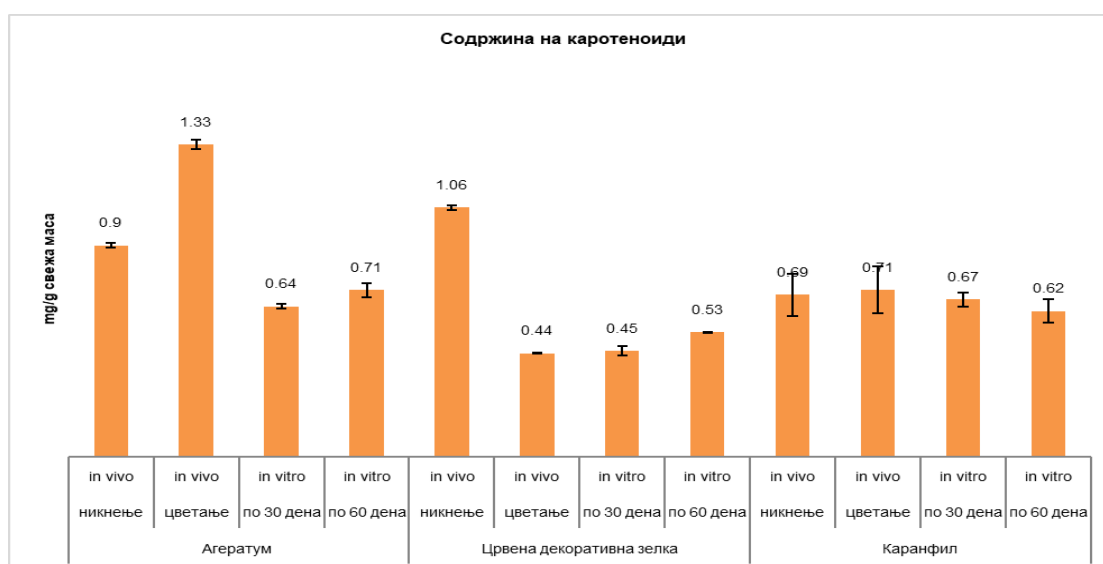
5.5.4. Каротеноиди

Добиените просечните вредности за вкупната содржина на каротеноиди на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 23. Просечните вредности за вкупната содржина на каротеноиди на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени и графички на Слика 41.

Табела 23. Просечни вредности за вкупни каротеноиди кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 23. Average values for combined carotenoids in various decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

Вид View	Фаза Phase	Услови Conditions	Средна вредност хлорофил mg/g свежа маса Mean value chlorophyll mg/g fresh mass	Стандардна девијација Standard deviation
Агератум (<i>Ageratum sp.</i> sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	0,9	0,01
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	0,64	0,01
	цветање	<i>In vivo</i>	1,33	0,02
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	0,71	0,03
Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea cv. Kyoto red given</i>)	никнење	<i>In vivo</i>	1,06	0,01
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	0,45	0,02
	цветање	<i>In vivo</i>	0,44	0,00
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	0,53	0,00
Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	никнење	<i>In vivo</i>	0,69	0,09
	по 30 дена	<i>In vitro</i>	0,67	0,03
	цветање	<i>In vivo</i>	0,71	0,10
	по 60 дена	<i>In vitro</i>	0,62	0,05



Слика 41. Просечни вредности за каротеноиди (mg/g свежа маса) кај разлините декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови

Figure 41. Average values for carotenoids (mg/g fresh weight) in different decorative species in *in vivo* and *in vitro* conditions

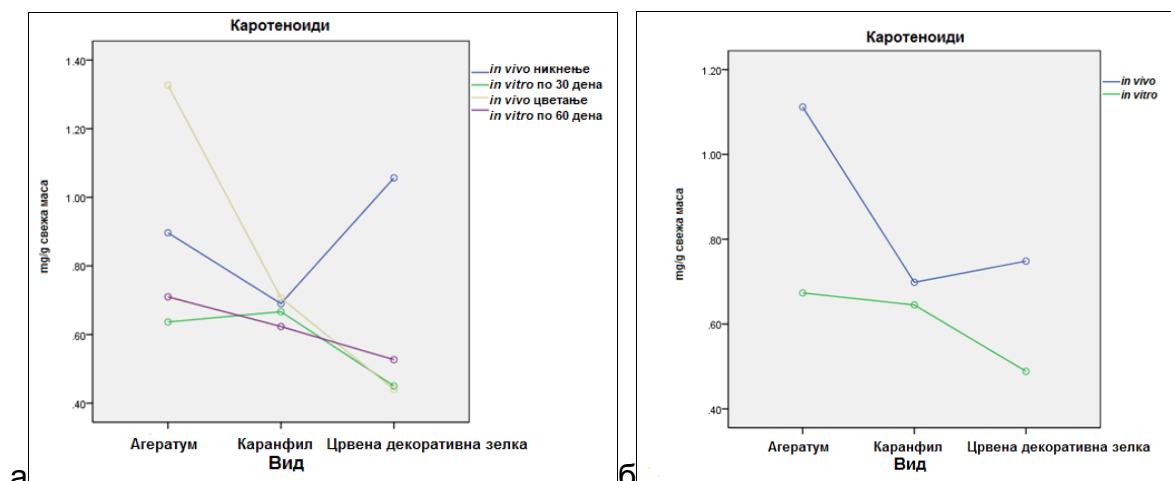
Во Табела 15 претставена е униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на каротеноиди во *in vivo* и *in vitro* услови.

На Слика 35 претставена е пресметаната гранична вредност на просечната содржина на каротеноиди на испитуваните декоративни видови, слика 35 а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и слика 35 б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови).

Табела 24. Униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фенофазата на просечната вредност на содржината на каротеноиди во *in vivo* и *in vitro* услови

Table 24. Univariate analysis of the influence of different decorative species, treatment and phenophase of the average value of the chlorophyll a content in *in vivo* and *in vitro* conditions

Фактор/ Factor	Сума на квадрати/ Sum of Squares	Степен на слобода / Degree of freedom (df)	Просек на квадрат / Mean Square	F тест /F test	Фактор / Factor	Сума на квадрати / Sum of Squares	Сигнификантност/ Significant	Сила на фактор/ Effect of factor (Partial eta squared)
Вид / Species	0,507	2	0,254	125,905	0,000	251,810	0,000	0,913
Третман и фенофаза/ Treatment & phenophase	0,020	2	0,010	5,000	0,000	10,000	0,000	0,946
Вид * третман и фенофаза/ Species * treatment & phenophase	0,848	4	0,212	105,237	0,000	420,949	0,000	0,946
Грешка / Error	0,048	24	0,002					
Вкупно / Total	21,264	36						
Corrected Total	2,211	35						



Слика 42. Пресметана гранична вредност на просечната содржина на каротеноиди на испитуваните декоративни видови а) за различните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови) и одделните фенофази на развој и б) за одделните третмани (*in vivo* и *in vitro* услови)

Figure 42. Estimated marginal means carotenoids content of the investigated ornamental species grown a) in different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions) and different phenophases and b) for different treatments (*in vivo* and *in vitro* conditions)

Во Табела 25 претставена е компаративната анализа помеѓу просечната содржина на каротеноиди кај сите испитувани декоративни видови.

Табела 25. Компаративна анализа помеѓу просечната содржина на каротеноиди кај различните декоративни видови

Table 25. Comparative analysis between the average content of carotenoids in different decorative species

Третман(А)/ Treatment (A)	Третман(Б)/ Treatment (B)	(А-Б) Разлика на просечни вредности/ (A-B) Mean difference	Стандардна грешка/ Standard error	Сигнификантност ^c / Significance ^c
<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	0,251 ^{*,a,b}	0,015	0,000
<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-0,251 ^{*,a,b}	0,015	0,000

Врз основа на пресмета гранична вредност.

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (А).

b. Пресметка на модифираните гранични вредности на популација (Б).

c. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

a. An estimate of the modified population marginal mean (I).

b. An estimate of the modified population marginal mean (J).

c. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments)

6. ДИСКУСИЈА

Резултатите од влијанието на испитуваните MS хормонални медиуми врз регенерацијата на меристемите и котиледоните од испитуваните декоративни видови дискутирани се во поднасловите од ова поглавје.

6.1. Култивирање на меристеми и котиледони и нивна регенерација по 30 и 60 дена

Меристемите и котиледоните од нивното почетно поставување беа префлени на хормонална подлога каде по 30 и 60 дена беше следена нивната регенерација.

6.2. Култура на меристеми како почетни експлантати

Литературните податоци, и нашите сопствени искуства, говорат дека морфогенетскиот потенцијал за органогенеза е најголем во меристемот, а ако се има предвид структурата на меристематското ткиво и неговиот низок степен на диференцијација, не постојат сомнежи за успешно организирање на вакво ткиво во изданок.

Меристемските експлантати секогаш покажуваат повисок регенеративен капацитет во однос на било кое друго немеристемско ткиво во услови *in vitro* (Phillips и Hubstenberger, 1985).

6.2.1. Црвена декоративна зелка - (*Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given*)

Резултатите кои се прикажани во Табела 4 се однесуваат на почетното поставување на меристемски пупки и формирање на изданоци после 30 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека меристемските експлантати од црвена декоративна зелка на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок. 18 меристемски

експлантати (70% од поставените пупки) на MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ дадоа изданок; 26 меристемски експлантати (65%) поставени на MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA дадоа изданок; 22 меристемски експлантати (70%) на MS + 2mg/l BA формираа изданок и на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA 32 пупки (64%) формираа изданок.

Резултатите од нашите истражувања се во согласност со истражувањата на Yang et al. (1991), Hossain et al. (1995), Munshi et al. (2007), Pavlović et al. (2010), кои користеле хипокотилии котиледони од декоративна зелка (*Brassica oleracea* cv.) на подлоги MS+1,0 mg/l BA, MS + 0,5 mg/l IBA, MS + 0,5 mg/l IBA, MS + 1 mg/l BA, MS + 0,1mg/l KIN, MS + 0,2 mg/l IBA. Како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога добиени се изданоци.



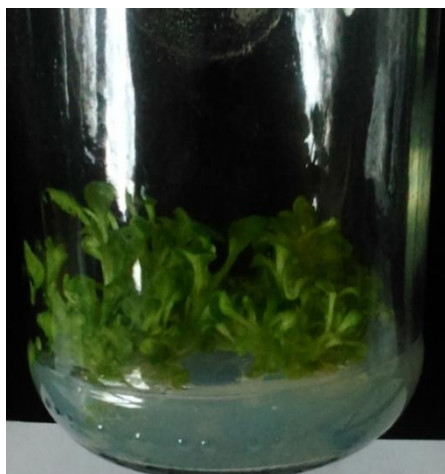
Слика 46. Изданок од црвена декоративна зелка (фотографија Велешанова, 2016)

Figure 46. Red cabbage sprouts (photo Velesanova, 2016).

6.2.2. Петунија (*Petunia* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 5 и 6 се однесуваат на почетното поставување на меристемски пупки и формирање на изданок и лисни розети после 30 и 60 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека меристемските експлантати од петунија на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок и лисна розета. На MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ 14 експлантати формираа лисна розета (100% од поставените пупки); MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA 8 експлантати формираа лисна розета (57%) (Слика 36,а); на MS + 2 mg/l BA 20 експлантати формираа изданок (83%), а на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA експлантатите не дадоа никаков резултат.

Во Табела 6 е преставено формирањето на изданок и лисна розета од петунија по 60 дена од нивното поставување. На MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ 19 експлантати формираа лисна розета (135% од поставените пупки); MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA 5 експлантати формираа лисна розета (35,7%) на MS + 2 mg/l BA 15 експлантати формираа изданок (62%), а на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA експлантатите не дадоа никаков развој.



Слика 47. Лисна розета кај петунија по 60 дена од почетното поставување (фотографија Велешанова, 2017)

Figure 47. Leaf rosette in petunia after 60 days of initial setting (photo Velesanova, 2017)

Според истражувањата на Kulpaet et al. (1989), Dewiret et al. (2007) и Abu-Raуа et al. (2010) кои користеле меристем и котиледони од петунија (*Petunia* sp.) на подлоги MS + 1,0 mg·dm⁻³ IAA, MS + 10 mg·dm⁻³, MS + 2 mg/l BA, како резултат на дејството на различни комбинации и концентрации на хормоните на раст на MS подлога, добиени се регенерирани изданоци.

Додека пак Thirukkumaran et al. (2009) користел котиледони од петунија и како резултат на различни концентрации на хормони на раст на MS подлога добил лисна розета.

Ornam (2010) вршел испитување на BA и NAA, а притоа докажал дека NAA не влијае значително врз регенерацијата додека BA покажал значителен ефект врз регенерацијата.

6.2.3. Каранфил (*Dianthus* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 7 и 8 се однесуваат на почетното поставување на меристемски пупки и формирање на изданоци после 30 и 60 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека меристемските експлантати од каранфил на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок, 23 и 37 експлантати формираа изданоци, соодветно на подлогите MS+ 2 mg/l BA +0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ и MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA (67-108% од поставените пупки); на подлогата MS + 2 mg/l BA, 31 експлантат формираше изданок (81%). На подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA, 33 експлантати формираа изданок (80%), (Слика 48,б). Кај каранфилот на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA се забележа дури и формирање на розов цвет во самата култура (Слика 48,в).

Во Табела 8 е преставено формирањето на изданок од каранфил по 60 дена од нивното поставување. На MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ 13 експлантати формираа изданок (85% од поставените пупки); MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA 26 експлантати формираа изданок (76%) на MS + 2mg/l BA 39

експлантати формираа изданок (102%) и на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA 24 експлантати формира изданок (58%).

Според податоците на Nugent *et al.* (1991) кој користел листови, сегменти од интернодијата и цветна дршка, најголем процент на формирање на изданок добил кај најмладите сегменти од интернодијата. Растенијата регенерирани од сегментите од интернодија растеле побрзо за разлика од растенијата регенерирани од листовите и цветната дршка.

Исто така, Jethwan *et al.* (1994) извршиле микропропагација на двата типа на каранфил, и Khawar *et al.* (2007) размножиле *D. barbatus* од култура на меристем и нодусни резниции (само првиот нодус под апикалната пупка). Кај видот *D.chinensise* постигната е регенерација на изданок од калус. Калусот е добиен со одгледување на базални сегменти од листови на MS медиумот со додавање на 2,4-D (2,4-дихлорофенокси оцетна киселина). Како резултат на тоа, калусот бил пренесен на свежа подлога со различен состав, а изданоките биле само индуцирани од калусот кој се одгледувал за време на субкултура на медиум со BAP во комбинација со фенил оцетна киселина (Jethwani и Kotha, 1996).



Слика 48. а) Лисна розета кај петунија, б) изданок кај каранфил, в) цвет кај каранфил (фотографија Велешанова, 2016)
Figure 48. a) Leaf rosette in petunia, b) sprouts in carnation, c) flower in top carnation (photo Velesanova, 2016).

6.2.4. Агератум (*Ageratum* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 9 се однесуваат на почетното поставување на меристемски пупки и формирање на изданоци после 30 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека меристемските експлантати од агератум на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок.

Седум меристемски пупки (85%) на MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ дадоа изданок; 6 меристемски пупки (100%) на MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA дадоа изданок; 2 меристемски пупки (16%) на MS + 5BAP дадоа изданок; 4 меристемски пупки (83%) на MS + 3 BA + 1,5 NAA формираа изданок.

Според некои автори регулаторите на раст влијаат на способноста на едно ткиво да одговорат на понатамошните развојни сигнали, многу често клетките реагираат различно во различни развојни фази при што може да се појави и интеракција помеѓу сигналните патеки на ауксин и цитокини.

6.3. Култура на котиледони како почетни експлантанти

За морфогенетскиот потенцијал и органогенезата кај котиледони постојат голем број на литературни податоци. За различниот морфогенетски потенцијал, низ целата должина на котиледонот, први реферираат полските автори Gatz & Rogozinska (1994). Тие во своите истражувања наместо цели котиледони користат 1/3 делови од котиледонот како апикални, медијални и базални сегменти.

6.3.1. Црвена декоративна зелка - (*Brassica oleracea* cv. *Kyoto red given*)

Резултатите кои се прикажани во Табела 10 се однесуваат на почетното поставување на котиледони и формирање на изданок после 30 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека котиледоните од црвена декоративна зелка на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок. Осумнаесет котиледони (37,5%) на MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ дадоа изданок; 31 котиледони (56%) поставени на MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA дадоа изданок; 30 котиледони (64,8%) на MS + 2 mg/l BA формираа изданок, а на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA котиледоните воопшто не формираа изданок.

6.3.2. Петунија (*Petunia* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 11 се однесуваат на почетното поставување на котиледони и формирање на лисни розети после 30 дена од нивното поставување на MS подлога со различен хормонален состав. Од овие резултати можеме да заклучиме дека котиледоните од петунија на MS подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ 16 експлантати формираа лисна розета (87,5%) и на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA 22 експлантати формираа лисна розета (63,7%), додека на останатите две подлоги MS + 2 mg/l BA и MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA не дадоа никаков развој.

6.3.3. Каранфил (*Dianthus* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 12 се однесуваат на почетното поставување на котиледони по 30 дена. Но поставените експлантати не дадоа никаков резултат бидејќи настана некротирање на истите.

6.3.4. Агератум (*Ageratum* sp.)

Резултатите кои се прикажани во Табела 13 се однесуваат на почетното поставување на котиледони по 30 дена. Но поставените експлантати не дадоа никаков резултат бидејќи настана некротирање на истите.

6.4. Вкоренување и адаптација на изданоци

И во нашите истражувања се потврдија констатациите дека ниски концентрации на ауксини се стимулирачки за ризогенезата, што е во согласност со истражувањата на Спасеноски и Колева (1994). Тоа значи дека, од сите комбинации најголем ефект имаа најниските аплицирани дози на ауксини. Од сите испитувани ауксини најголем ефект врз вкоренувањето на пиперката покажа NAA, кој и во многу ниски концентрации резултира со висок процент на вкоренување.

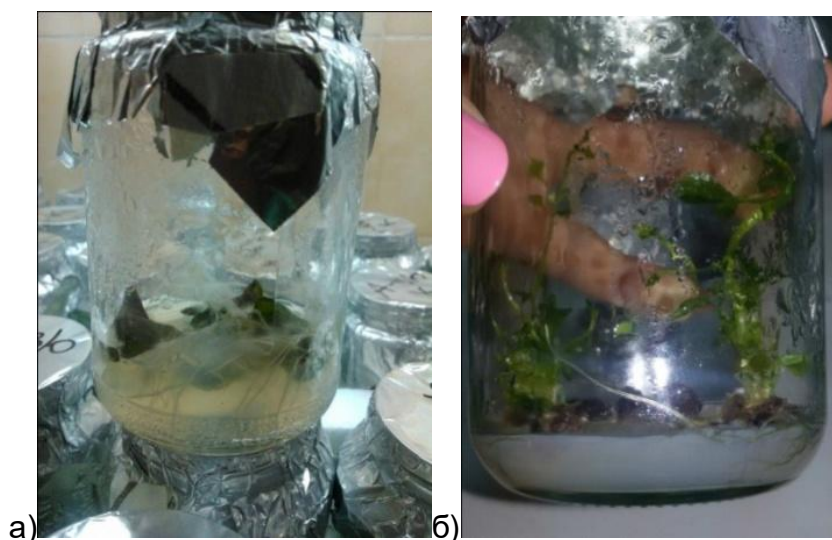
На Слика 30, после 60 дена од поставувањето на културата на изданоци беше утврдено кои од комбинациите на регулатори на раст имаат позитивен ефект на формирање на корења кај изданоците од петунија, каранфил и црвена зелка.

Кај петунија само 5 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA додека останатите три не образуваа корења.

Кај каранфил 13 и 12 изданоци формираа корења соодветно, на подлогите MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ и MS + 2 mg/l BA + 0,1 NAA; на подлогата MS + 2mg/l BA 12 регенеранти формираа корења; и на подлогата MS + 5 mg/l BA + 5 mg/l NAA 15 регенеранти формираа исто така корења.

Кај црвена декоративна зелка 3 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1 mg/l IAA + 0,1 mg/l GA₃ и 3 регенеранти формираа корења на подлогата MS + 2 mg/l BA + 0,1mg/l NAA додека останатите две не образуваа корења. Кај агератумот регенерантите не формираа корења.

Од добиените резултати (Слика 49) е очигледно дека процентот на вкоренување кај сите испитувани видови се движи од 7% до 38%. Вредноста на процентот на формирање на корени има сигнификанти разлики помеѓу испитуваните видовите. Видовите петунија (35%), каранфил (38%) и црвена зелка (7%) покажаа вредности кои се разликуваат сигнификантно од видот Агератум (0%) кој не формираше корени на медиум збогатен со ауксини.



Слика 49. Вкоренување а) црвена декоративна зелка, б) каранфил (фотографија Велешанова, 2017)
Figure 49. Rooting a) red decorative cabbage, b) carnation (photo Velesanova, 2017)

6.5. Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофили и каротеноиди) на декоративните видови во *in vitro* и *in vivo* услови

Во текот на истражувањето беше одредувана содржината на хлорофил а, хлорофил б, вкупни хлорофили и каротеноиди во растителен материјал од *in vivo* и *in vitro* услови со примена на UV/VIS спектрофотометриски метод.

6.5.1. Хлорофил а

Резултатите кои се прикажани во Табела 14 и Слика 34 се однесуваат на просечната вредност и стандарната девијација за хлорофил а, кај различните декоративни видови.

Кај видот агератум просечна вредност на содржината на хлорофил а во фаза на никнење и цветање изнесува 8,41 mg/g и 13,6 mg/g,соодветно, во *in vivo* услови. Од друга страна, просечната вредност на анализираните примероци во *in vitro* услови по 30 и 60 дена, изнесува 7,45 mg/g и 8,18 mg/g, соодветно.

Просечната вредност на содржината на хлорофил а кај видот црвена декоративна зелка во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови изнесува 10,32 mg/g и 3,98 mg/g, додека просечната вредност на содржината на хлорофил а по 30 и 60 дена во *in vitro* услови изнесува 5,14 mg/g и 5,60 mg/g свежа маса.

Кај видот каранфил во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови просечната вредност на хлорофил а изнесува 3,09 mg/g и 8,31 mg/g, соодветно. Кај истиот вид, по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 7,74 mg/g и 7,48 mg/g свежа маса.

Во Табела 15 е прикажана униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фазата на просечната вредност на содржината на хлорофил а, во *in vivo* и *in vitro* услови. Се гледа дека односот на заемното дејство помеѓу различните декоративни видови, третманот и фенофазата имаат најголемо влијание врз просечната содржина на хлорофил а ($\eta^2 = 0,979$), видот има помало дејство ($\eta^2 = 0,961$), додека заедничкото дејство третманот и фенофазата врз содржината на хлорофилот изнесува $\eta^2 = 0,673$. Овие резултати се потврдуваат со пресметаната гранична вредност на просечната содржина на испитуваните декоративни видови (Слика 35,а).

Резултатите кои се прикажани во Табела 16 се однесуваат на компаративна анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил а, кај различните декоративни видови.

Компаративната анализа на просечната содржина на хлорофил а, кај различните декоративни видови одгледувани во *in vivo* и *in vitro* услови покажува дека декоративните видови одгледувани во *in vitro* услови имаат за 1,165 mg/g повисока просечна содржина на хлорофил а, од декоративните видови одгледувани *in vivo* услови, со пресметана статистички значајна

сигнификантност (Табела 16). Но, од графичкото претставување на пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а на ниво на експеримент се гледа дека содржината на хлорофил а кај каранфил во *in vitro* услови е повисока во однос на истата во *in vivo* услови (слика 35, б). Тоа се должи на способноста на каранфилот во *in vitro* услови побрзо да започне со синтезата на хлорофил а, за разлика од другите видови. Оваа најверојатно се должи на генетската особина на каранфилот во *in vitro* услови да покажува подобар механизам на промена на режимот на исхрана од хетеротрофен (на почетокот на културите) во автотрофен со синтезата на фотосинтетски пигменти.

6.5.2. Хлорофил b

Резултатите од добиените просечни вредности за вкупната содржина на хлорофил б на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 17 и Слика 37.

Кај видот агератум просечна вредност на содржината на хлорофил b во фаза на никнење и цветање изнесува 15,11 mg/g и 18,07 mg/g во *in vivo* услови, додека просечната вредност по 30 и 60 дена во *in vitro* услови изнесува 8,46 mg/g и 9,39 mg/g.

Просечната вредност на содржината на хлорофил b кај видот црвена декоративна зелка во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови изнесува 16,69 mg/g и 7,67 mg/g, додека по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 5,95 mg/g и 7,32 mg/g свежа маса.

Кај видот каранфил во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови просечната вредност изнесува 7,37 mg/g и 10,11 mg/g, додека по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 8,9 mg/g и 8,39 mg/g свежа маса.

Во Табела 18 е прикажана Униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фазата на просечната вредност на содржината на хлорофил b, во *in vivo* и *in vitro* услови. Се гледа дека

действието на третманот и фазата имаат најголемо влијание врз просечната содржина на хлорофил b ($\eta^2 = 0,942$), односот на заемното дејство помеѓу различните декоративни видови, имаат помало влијание врз просечната содржина на хлорофил b ($\eta^2 = 0,942$). Третманот и фазата како фактори кои имаат влијание врз содржината на хлорофилот b, се покажа дека оваа взаемно дејство е мало и изнесува ($\eta^2 = 0,446$). Овие резултати се потврдуваат со пресметаната гранична вредност на просечната содржина на испитуваните декоративни видови (Слика 38, а).

Резултатите кои се прикажани во Табела 19 се однесуваат на компаративна анализа помеѓу просечната содржина на хлорофил b, кај различните декоративни видови. Компаративната анализа на просечната содржина на хлорофил b кај различните декоративни видови одгледувани во *in vivo* и *in vitro* услови покажува дека декоративните видови одгледувани во *in vitro* услови имаат за 4,435 mg/g пониска просечна содржина на хлорофил b од декоративните видови одгледувани *in vivo* услови, со пресметана статистички значајна сигнификантност (Табела 19). Но, од графичкото претставување на пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил b на ниво на експеримент се гледа дека содржината на хлорофил b кај каранфил во *in vitro* услови е скоро иста со таа во *in vivo* услови (Слика 38, б).

6.5.3. Вкупни хлорофили a+b

Резултатите од добиените просечни вредности за вкупната содржина на хлорофили a+b на истражуваните видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 20 и Слика 40.

Кај видот агератум просечна вредност на содржината на хлорофили a+b во фаза на никнење и цветање изнесува 23,52 mg/g и 31,68 mg/g во *in vivo* услови, додека просечната вредност по 30 и 60 дена во *in vitro* услови изнесува 15,92 mg/g и 17,68 mg/g.

Просечната вредност на содржината на хлорофили a+b кај видот црвена декоративна зелка во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови изнесува

27,02 mg/g и 11,66 mg/g, додека по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 11,09 mg/g и 12,92 mg/g свежа маса.

Кај видот каранфил во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови просечната вредност изнесува 11,36 mg/g и 18,41 mg/g, и по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 16,65 mg/g и 15,87 mg/g свежа маса.

Во Табела 21 е прикажана униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фазата на просечната вредност на содржината на вкупни хлорофили а+b, во *in vivo* и *in vitro* услови.

Се гледа дека дејството на различните декоративни видови, третманот и фазата имаат најголемо влијание врз просечната содржина на вкупни хлорофили а+b ($\eta^2 = 0,969$), односот на заемното дејство помеѓу различните декоративни видови, имаат помало влијание врз просечната содржина на вкупни хлорофили а+b ($\eta^2 = 0,953$), додека третманот и фазата како фактори кои имаат влијание врз содржината на вкупните хлорофили а+b, се покажа дека оваа взаемно дејство е мало и изнесува ($\eta^2 = 0,188$). Овие резултати се потврдуваат со пресметаната гранична вредност на просечната содржина на испитуваните декоративни видови (Слика 40, а).

Резултатите кои се прикажани во Табела 22 се однесуваат на компаративна анализа помеѓу просечната содржина на вкупните хлорофили а+b, кај различните декоративни видови.

Компаративната анализа на просечната содржина на вкупни хлорофили а+b кај различните декоративни видови одгледувани во *in vivo* и *in vitro* услови покажува дека декоративните видови одгледувани во *in vitro* услови имаат за 5,587 mg/g пониска просечна содржина на вкупни хлорофили а+b од декоративните видови одгледувани *in vivo* услови, со пресметана статистички значајна сигнификантност (Табела 22).

Од графичкото претставување на пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофили а+b на ниво на експеримент се гледа дека содржината на хлорофили а+b кај агератум во *in vivo* услови е многу повисока во однос на истата во *in vitro* услови (Слика 40, б). Ова се должи на различниот третман на одгледување и различниот начин на исхрана во *in vivo* и *in vitro* услови.

6.5.4. Каротеноиди

Резултатите од добиените просечни вредности за вкупната содржина на каротеноиди на истражуваните декоративни видови во *in vivo* и *in vitro* услови се претставени во Табела 23 и Слика 43.

Кај видот Агератум просечна вредност на содржината на каротеноиди во фаза на никнење и цветање изнесува 0,9 mg/g и 1,33 mg/g во *in vivo* услови, додека просечната вредност по 30 и 60 дена во *in vitro* услови изнесува 0,64 mg/g и 0,71 mg/g.

Просечната вредност на содржината на каротеноиди кај видот црвена декоративна зелка во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови изнесува 1,06 mg/g и 0,44 mg/g, додека по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 0,45 mg/g и 0,53 mg/g свежа маса.

Кај видот каранфил во фаза на никнење и цветање во *in vivo* услови просечната вредност изнесува 0,69 mg/g и 0,71 mg/g, а по 30 и 60 дена во *in vitro* услови просечната вредност изнесува 0,67 mg/g и 0,62 mg/g свежа маса.

Во Табела 24 е прикажана униваријанта анализа на влијанието на различните декоративни видови, третманот и фазата на просечната вредност на содржината на каротеноиди, во *in vivo* и *in vitro* услови. Се гледа дека дејството на различните декоративни видови, третманот и фазата имаат најголемо влијание врз просечната содржина на каротеноиди ($\eta^2 = 0,946$). Односот на заемното дејство помеѓу различните декоративни видови, имаат помало влијание врз просечната содржина на каротеноиди ($\eta^2 = 0,913$), додека третманот и фазата како фактори кои имаат влијание врз содржината на каротеноиди, се покажа дека оваа взаемно дејство е мало и изнесува ($\eta^2 = 0,294$). Овие резултати се потврдуваат со пресметаната гранична вредност на просечната содржина на каротеноиди на испитуваните декоративни видови (Слика 42, а).

Резултатите кои се прикажани во Табела 25 се однесуваат на компаративна анализа помеѓу просечната содржина на каротеноиди, кај различните декоративни видови.

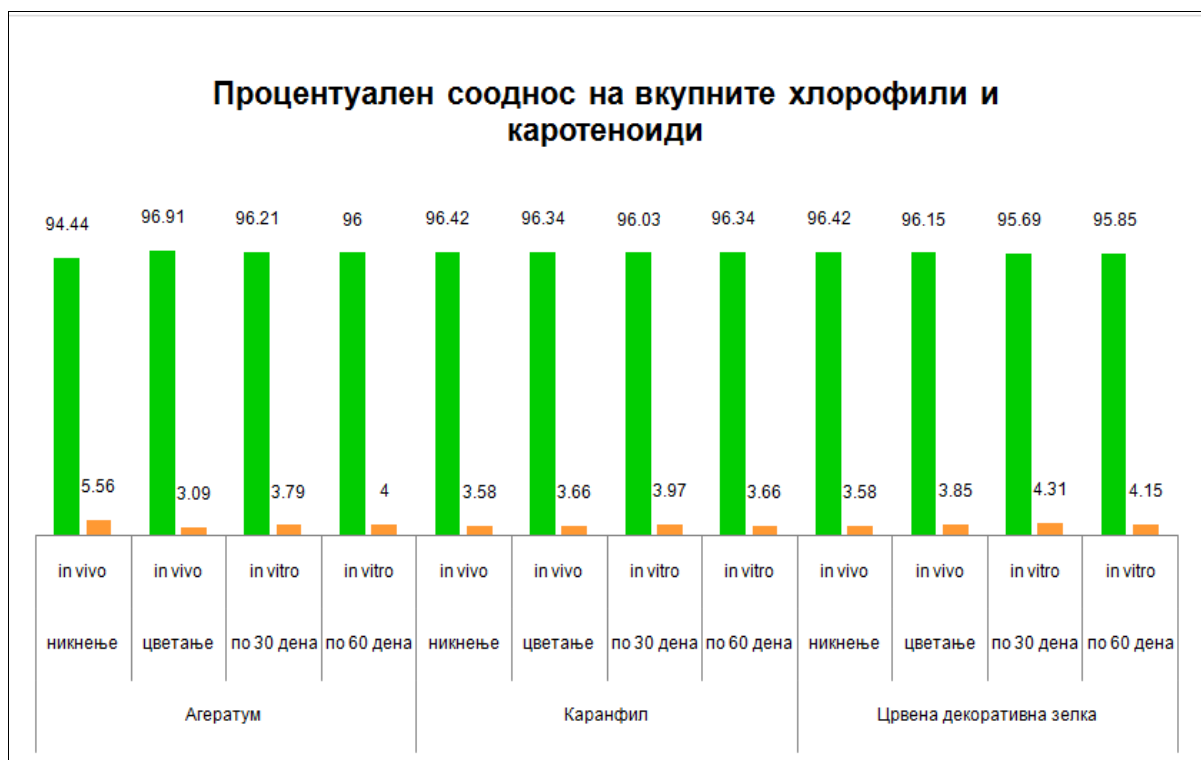
Компаративната анализа на просечната содржина на каротеноиди кај различните декоративни видови одгледувани во *in vivo* и *in vitro* услови покажува дека декоративните видови одгледувани во *in vitro* услови имаат за 0,015 mg/g пониска просечна содржина на каротеноиди, од декоративните видови одгледувани *in vivo* услови, со пресметана статистички значајна сигнификантност (Табела 25). Од графичкото претставување на пресметаната гранична вредност на просечната содржина на каротеноиди на ниво на експеримент се гледа дека содржината на каротеноиди кај агератум во *in vivo* услови е многу повисока во однос на истата во *in vitro* услови (Слика 42, б). Ова се должи на различниот третман на одгледување и различниот начин на исхрана во *in vivo* и *in vitro* услови, а истата динамика беше забележана и за вкупната содржина на хлорофили.

6.6. Соодност на фотосинтетските пигменти

Од фотосинтетските пигменти каротеноидите ја апсорбираат сончевата светлина со 10-20 % од вкупната сончева светлина која се прима од листовите (Колева-Гудева, 2010). Согласно на овој факт, процентуалниот сооднос на вкупните хлорофили спрема вкупните каротеноиди генерално изнесува 90-80 % наспроти 10-20 % во корист на хлорофилите.

Табела 26. Процентуален сооднос на одредувани фотосинтетски пигменти кај црвена декоративна зелка, петунија, каранфил и агератум
Table 26. Percentage ratio of certain photosynthetic pigments in red decorative cabbage, petunia, carnation and Ageratum sp.

Вид	хлорофили : каротеноиди <i>in vivo</i> (%)		хлорофили : каротеноиди <i>in vitro</i> (%)	
	фаза никнење	фаза цветање	по 30 дена	по 60 дена
Агератум (<i>Ageratum</i> sp.)	94,44:5,56	96,91:3,09	96,21:3,79	96:4
Каранфил (<i>Dianthus</i> sp.)	96,42:3,58	96,34:3,66	96,03:3,97	96,34:3,66
Црвена декоративна зелка (<i>Brassica oleracea</i> cv. Kyoto red given)	96,42:3,58	96,15:3,85	95,69:4,31	95,85:4,15



Слика 50. Процентуален сооднос на вкупните хлорофили и каротеноиди во *in vivo* и *in vitro* услови.

Figure 50. Percentage ratio of total chlorophyll and carotenoids in *in vivo* and *in vitro* conditions.

Со промената на начинот на исхрана од хетеротрофен (во културите), во автотрофен (за време на адаптацијата), неизбежни се промени во фотосинтетскиот и ензимскиот систем на *in vitro* регенерираните растенија.

Ако изданоците во култури ја имаат зелената боја, нема доволно докази за нивна фотосинтетска активност. Фотосинтетските пигменти, се присутни во изданоци во култура, но ензимите за нивна активација отсутнуваат или ако се присутни тие може да се неактивни (Murashige, 1979). Ензимската синтеза или нивната активација најверојатно почнува непосредно по пренесувањето на изданоците од културите надвор. Во контекст на истиот автор, интензивната синтеза на сите растителни пигменти и нивните ензими започнува неколку дена по изнесувањето на културите во надворешни услови.

Од нашите резултати за содржината на растителни фотосинтетски пигменти може да се констатира дека содржината на сите испитани растителни

фотосинтетски пигменти по 30 и 60 дена од нивното поставување е помала во *in vitro*, а во фазата на никнење и цветање е поголема во *in vivo* услови. Имајќи ги предвид гореспоменатите факти добиените резултати за содржината на растителните пигменти сосема се разбирливи.

Тоа значи дека *in vitro* добиените растенија отпочнуваат со својата фотосинтетска активност непосредно пред нивната целосна адаптација, затоа содржината на растителни фотосинтетски пигменти генерално е помала во *in vitro* културите.

Откако ензимската биосинтеза е воспоставена и фотосинтетските процеси се отпочнати, регенерантите ја зголемуваат содржината на фотосинтетски пигменти. Тоа резултира и со поголеми вредности на истите во *in vivo* услови и во двете фенофази на испитување, во споредба со *in vitro* услови.

7. ЗАКЛУЧОК

Декоративните видови петунија, каранфил, црвена декоративна зелка и агератум имаат голем потенцијал за регенерација во *in vitro* услови. Резултатите од истражувањето во овој магистерски труд покажуваат дека со употреба на соодветен медиум во услови *in vitro* значително се подобрува растот и развојот на културите.

Врз основа на добиените резултати од досегашните испитувања можеме да ги извлечеме следните заклучоци:

1. Меристемските експлантати од каранфил после 30 и 60 дена од нивното почетно поставување на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок. Кај каранфилот најголем е процентот на експлантати кои формираа изданок и се движи од 80 - 100%.
2. Меристемските експлантати од петунија на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок и лисна розета 57-100%.
3. За агератумот можеме да се заклучи дека неговите меристемски експлантати на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок 83%.
4. Меристемските експлантати од црвена декоративна зелка на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање само на изданок 70%.
5. На хранливата подлога MS + 2 mg/l BA +0,1 NAA кај каранфил се забележа и формирање на розов цвет, што укажува на фактот дека оваа култура може да цвета и во услови *in vitro*, што не се забележа кај другите испитувани видови.
6. Од почетното поставување на котиледони од црвена декоративна зелка на MS подлогата со сите испитувани комбинации од регулатори на раст резултираа со формирање на изданок после 30 дена од нивното поставување.

7. Најдобро вкоренување на изданоци кај декоративните видови во услови *in vitro* е постигнато во присуство на ауксините IBA и IAA, а најдобар медиум за вкоренување е MS + 0,5 mg/l IAA+2,5 mg/l IBA.
8. Процентот на вкоренување кај изданоците се движи од 7% до 38%. Вредноста на процент на формирање на корени има сигнификанти разлики помеѓу видовите. Видовите каранфил (38%), петунија (35%) и црвена зелка (7%) покажаа вредности кои се разликуваат од видот агератум (0%) кој воопшто не формираше корени.
9. Од нашите резултати за содржината на растителни фотосинтетски пигменти може да се констатира дека содржината на сите испитани растителни фотосинтетски пигменти по 30 и 60 дена од нивното поставување е помала во *in vitro* услови. Во надворешни услови, вредноста за фотосинтетските пигменти генерално е поголема во фазата на никнење од фенофазата цветање.
10. *In vitro* добиените растенија отпочнуваат со својата ефективна фотосинтетска активност непосредно пред нивната целосна адаптација, затоа содржината на растителни фотосинтетски пигменти е помала во културите во 30 дена, а поголема кај оние во 60 дена од поставувањето.
11. Пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил а, на ниво на експеримент, се гледа дека кај каранфил во *in vitro* услови е повисока во однос на истата во *in vivo* услови, што претставува отстапка од другите испитувани видови. Тоа резултираше и со појава на цвет кај каранфилот во *in vitro* услови, како доказ дека фотосинтетската активност кај оваа култура почнува уште во *in vitro* услови.
12. Пресметаната гранична вредност на просечната содржина на хлорофил b, на ниво на експеримент, се гледа дека содржината на хлорофил b кај каранфил во *in vitro* услови е скоро иста со таа во *in vivo* услови.
13. Пресметаната гранична вредност на просечната содржина на каротеноиди на ниво на експеримент се гледа дека содржината на каротеноиди кај агератум во *in vivo* услови е многу повисока во однос на истата во *in vitro* услови. Ова се должи на различниот третман на одгледување и различниот начин на исхрана во *in vivo* и *in vitro* услови, а истата динамика беше забележана и за вкупната содржина на хлорофили.

Сето погоре заклучено укажуваат на фактот дека декоративните растенија имаа висок потенција за регенерација во услови *in vitro*. Ова отвора големи можности и потенцијал за развивање на нови производствени методи во Република Македонија, кои за жал до денес не се развиени на завидно ниво.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Aamir Ali¹, Humera Afrasiab, Shagufta Naz, Mamoon Rauf And Javed Iqbal (2008) An Efficient Protocol For In Vitro Propagation Of Carnation (*Dianthus Caryophyllus*).
- Атанасовка, J. (1995) Перени и едногодишни цветни култури (скрипта за интерна употреба); Скопје 1995.
- Aneta Gerszberg & Katarzyna Hnatuszko-Konka & Tomasz Kowalczyk - In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea*.
- Anna A. Erst^(1*), Andrey S. Erst⁽²⁾ and Dmitry N. Shaulo *In vitro* Propagation of *Dianthus mainensis*, an Endemic Plant from the West Sayan (North Asia).
- Anand M. and Mehra P. (1983) Callus induction, growth and differentiation in *Dimorphotheca ecklonis*. *Phytomorphology* 32:197-204
- Altvorstvan, A.C., Yancheva, S., Dons, H. (1995) *Cells with in the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40 (151-157).
- Ali A., Afrasiab H., Naz H., Rauf M. and Iqbal J. (2008) An efficient protocol for in vitro propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Pak. J. Bot.*, 40(1): 111-121.
- Bajaj YPS and Nietsch P (1975) In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Capitata*). *J. Exp. Bot.* 26: 883-890.
- Badoni, A & Chauhan, J. (2010). In Vitro Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. *Academia Arena*. 2: 24- 27.
- Bahita, P & Ashwath, N. (2005) Effect of Medium pH on Shoot Regeneration from the Cotyledonary Explants of Tomato. *Biotechnology*. 4: 7- 10.
- Burchi G., Griesbach R.J., Mercuri A., De Benedetti L., Priore D., Schiva T. (1995) Color modification in petunia using the *l*c regulatory gene from maize. *J. GENET BREED.* 49: 163- 168.

- Bouman H., De Klerk G.J. (1996) Somaclonal variation in biotechnology of ornamental plants. In: Geneve R., Preece J., Merkle S. (eds.), *Biotechnology of Ornamental Plants*. CAB International, pp. 165-183.
- Boxus, Ph. (1980) Micropropagation, an industrial propagation method of quality plants true to type and at a reasonable price, *Plant Cell Cultures*, 265-269.
- Bhala PL, Singh MB (2008) Agrobacterium mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat Protoc* 3:181–189.
- Chowdhury ML and Prakash P (1992) Influence of Kn and NAA on shoot and root growth of carnation (*Dianthus caryophyllus*) *in vitro*, *Agri Sci. Digest*. 12 (12):105-108.
- Christopher B. (1994) *Encyclopedia of Gardening*. The American Horticultural Society, pp.170-181, 546, 560.
- Christianson, M.L., Warnick, D.A. (1985) Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *DEV BIOL*. 122: 494-497.
- Christianson M.L., Warnick D.A. (1988) Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HORT SCI*. 23:515-519.
- Caboni E and Tonalli MG (1999) Effect of 1,2 - Benzisoxazole-3 acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple. *Plant Cell Reports*. 18: 985- 988.
- Cardoza V, Stewart NC (2004) *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:542–551
- Cheng PK, Lakshmanan P, Swarup S (2001) High-frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling *Brassica oleracea in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:592–598
- Danuta Kulpa, Natalia Nowak - *In vitro* flowering of *Petunia x atkinsiana* D. Don
- Deberg, P.S. (1995) Evolution and automation in micropropagation and artificial seed Production. In: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, (Eds. M. Terzi et al.), Kluwer Academic publisher, Netherlands, 95-104
- Debergh, P. C., Read, P. E., (1991) *Micropropagation, Technology and Application*, Kluwer Academic Publisher, 1 – 13.

- Dewir Y., Chakrabart D., Ali M., Singh N., Hahn E., Paek K. (2007) Influence of GA₃, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 90: 225-235.
- Dewir Y., Chakrabart D., Ali M., Singh N., Hahn E., Paek K. (2007) Influence of GA₃, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 90: 225-235.
- Dixon R.A., Gonzales R.A. (eds) (1985) Plant cell culture: a practical approach. Oxford University Press, New York Published by British Library Cataloguing in Publication Data.
- Druat, Ph., (1980) Plantlet regeneration from root callus of different *Prunus* species, Scientia Horticulturae, 12. 339 – 342.
- Earle, E.D., Langhans, R.W. (1975) *Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium*. HortScience 10 (608–610)
- Fisher, M., M. Ziv and A. Vainstein. (1993) An efficient method for adventitious shoot regeneration from cultured carnation petals. *Sci. Hort.*, 53(3): 231-237.
- Fraga M., Mertxe A., Ellul P., Borja M. (2004) Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*, HortScience 39 (4) (112-115)
- Frey and Janick (1991) Organogenesis in Carnation, J. Amer Soc. Hort. Sci. 116(6): 1108-1112.
- Gamborg, O.L. Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. (50):151-158.
- Geneve R.L., Preece J.E., Merkle S.A. (1997) Biotechnology of ornamental plants. PLANT TISSUE CULT. BIOTECHNOL. (3)2: 112.
- Gatz A., Rogozinska J. (1994) *In vitro* organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annuum* L., cv. bryza, Acta Societates botanicorum Poloniae, Vol. 63 No. 3-4: 255-258.
- George, E.F. (2008) Plant propagation by tissue culture. 3rd edition. Volume The Background. Published by Springer – The Netherlands

- George, E.F. (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 1. 2nd edition. Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England
- Ѓорѓиевски, М. (2012) Градинарство и цвеќарство Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип 2010.
- Gupta PK, Nadgir AL, Mascarenhas AF and Jagannathan V (1980) Clonal multiplication of *Tectona grandis* L. by tissue culture. Plant Sci. Lett. 17: 259-268.
- Guo DP, Zhu ZJ, Hu XX, Zheng SJ (2005) Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of team mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsa*). Plant Cell Tiss Organ Cult 83:123–127
- Хаџи Пецова, С. (2017) Цвеќарство, Основи за производство и цветни култури, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, Факултет за земјоделска наука и храна.
- Hassan Abu-Qaoud¹, Anas Abu-Rayya¹ and Sami Yaish² - In vitro REGENERATION AND SOMACLONAL VARIATION OF *Petunia* hybrid.
- Hall, R. (1999) Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology). First Edition. Humana Press. United State of America. P. No. 7, 12.
- Hutchinson JF (1995) Tissue culture: propagation of fruit trees. In: Proc. COSTED symp. In: Tissue Culture of Economically Important Plants. Rao A.N. (Ed.), Singapore, pp. 113-120, 1981
- Hossain M, Islam R, Islam A and Joarder OI (1995) Direct organogenesis in cultured hypocotyl explants of *Aegle marmelos* Corr. J. Hort. Sci. 68: 495-498
- Idowu, A., Ibitoye, O & Ademoyegun, O. (2009) Tissue Culture as A plant Production Technique for Horticultural Crops. African Journal of Biotechnology. 8: 3782-3788.
- Jelaska, S. (1994) Kultura biljinih stanica I tkiva: temeljna istrazivanja I primjena. Zagreb, Monografije, 42.
- Jethwani V., Kothari S.L. (1993) Micropropagation of *Dianthus barbatus* and *D. chinensis* through cotyledonary node culture, Plant Tissue Culture 2 (91-96).

- Jethwani V., Kothari S.L. (1996): Phenylacetic acid induced organogenesis incultured leaf segments of *Dianthus chinensis*, Plant Cell Reports 15 (869-872).
- Jethwani V., Sharma V.K., Kothari S.L. (1994) Micropropagation of *Dianthuschinensis* and *Dianthus barbatus* through shoot tip culture, Journal of IndianBotanical Society 73 (357-358 Kantamaht Kanchanapoom1*, Nirunya Buntin1 and Kamnoon.
- Kanchanapoom2Micropropagation through adventitious shoot regeneration from leaf culture of *Torenia fournieri* Lind.).
- Kantia A., Kothari S.L. (2002) High efficiency adventitious shoot bud formationand plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L., ScientiaHorticulturae 96 (205-212).
- Колева Гудева, Л. (2010), Физиологија на растенијата, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип.
- Koleva Gudeva, Liljana and Gulaboski, Rubin and Trajkova, Fidanka and Maksimova, Viktorija and Velesanova, Ivana (2017) Application of biotechnological methods for improvement of plant species. [Project] (In Press).
- Kovac, J. (1995) Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* sub sp. Bohemicus-an endangeredendemic from the Czech Republic. *Biol.*, 37: 27-33.
- Khachatourians, G., Hui, Y., Scorza, R & Nip, W. (2002) Transgenic Plants and Crops. First Edition. Marcel Dekler, Inc. New York. P. No. 88, 89, 90.
- Larcher, W. (2003) Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Springer.
- Lazzeri PA and Dunwell JM (1984) In vitro shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* L. var. Capitata . *Annals Bot.* 54(3): 341-350.
- Leva, A & Rinaldi, L. (2012). Recent Advances in Plant *In Vitro* Culture. First Edition. InTech. Croatia. P. No. 8, 9, 32, 34, 63, 65, 94.
- LevyY., Dean C., (1998) The Transition to flowering. *Plant Cell* 10(12): 1973-1989.
- Leshem B. 1986. Carnation plantlets from vitrifi ed plants asa source of somaclonal variation. *Hort. Sci.* **21**: 320-321.

- Lumbomski, M. and M. Jerzy. (1989) *In vitro* propagation of pot carnation from stem internodes. *Acta Hort.*, 251: 235-240.
- Litz RE and Jaiswal VS (1990) Micropropagation of tropical and subtropical fruits. *In: Micropropagation technology and application*. Debergh PC and Zimmerman R.H. (Eds.), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, pp. 247-266.
- Majada, J.P., M.A. Fal and R. Tames. (1997) Vented Culture Vessels used for Control of Hyperhydricity in Liquid Micropropagation Systems. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.*, 33:62-69.
- Marija J. Marković, Razmnožavanje nekih ugroženih vrsta karanfila (*Dianthus* L.) metodom mikropogacije.
- Mastaneh Mohammadi *In vitro* organogenesis of *Ageratum* sp. *houstonianum* (Asteraceae)
- Messeguer J, Arconada MC & Mele E. (1993) Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Ann. Bot.* 68: 563-568
- Мојсов Киро (2013), Практикум по органска хемија, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип.
- Mol J.M.N., Koes R., van den Berg E.A., Reif H.J., Kreuzaler F., Veltkamp E. (1985) The genetics of secondary metabolite production in higher plants: the flavonoid. genes of petunia as a model system. *ADV. AGRI. BIOTECHNOL.* 13:122-123.
- Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Čmelik, Z., Puškar, B & Jurković, Z. (2013) In vitro Sterilization Procedures for Micropropagation of Oblacinska Sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences.* 58: 117- 126.
- Murashige, T. (1979) Principles of rapid propagation, Propagation of higher plants through Tissue Culture, Pr 14 -24.
- M. K. Munshi, P.K. Roy, M.H. Kabir and G. Ahmed-In vitro Regeneration of Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata) through Hypocotyl and Cotyledon Culture „Национална стратегија за земјоделство и рурален развој“, 2007-2013.
- Nadgauda R.S., John C.K., Parasharami V.A., Joshi M.S., Mascarenhas A.F., (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 48: 181-188.

- Nugent, G., Wardley, R.T., Lu, C. (1991) *Plant regeneration from stem and petal of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*. Plant Cell Reports 10 (477-480).
- Ovesna J, Ptacek L, Opatrny Z (1993) Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. Biol Plant 35:107–112.
- Pareek A., Pareek L.K. (2005) De-novo differentiation of shoots of *Dianthus barbatus* from callus cultures, Journal of Cell and Tissue Research 5 (327-329).
- Pareek, A., Kantia, A., Kothari, S.L. (2004) In vitro cloning of ornamental species of *Dianthus*. Indian Journal of Biotechnology 3 (263-266).
- Pareek, A., Kothari, S.L. (2003) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. Scientia Horticulturae 98 (449-459).
- Phillips C.G., Hubstenberger F.J. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures, Plant Cell and Tissue Organ Culture 4: 261-269.
- Petru, E., Landa, Z. (1974) *Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated in vitro*. Biologia Plantarum 16 (450-453).
- Petru E. & Landa Z. (1974) Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated *in vitro*. *Biol. Plant.* **16**: 450-453.
- Plastira, V.A. and A.K. Perdikaris. (1997) Effect of genotype and explant type in regeneration frequency.
- Pollard J.W., Walker J.M. 1990. Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press, pp. 71-79.
- Quattrocchio F., Wing J.F., van der Woud K., Mol J.N.M., Koes R. (1998) Analysis of Bhlh and myb domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. PLANT J. 13: 475-488.
- Radojević Lj, Marinković N & Jevremović S. (1997) Vegetativno raznožavanje u kulturi meristema i segmenata stabla *Dianthus petreus* Waldst ET Kit. subsp. *noeanus*. Glasnik Botaničke bašte Univerziteta u Beogradu **31**: 1-7.

- Renaudin J.P., Tournaire C., Teyssendier de la Serve B. (1991) Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud formation in protoplast-derived *Petunia* hybrid callus. *PHYSIOL. PLANT.* 82: 48-56.
- Redenbaugh, K. (1991) Applications of micropropagation for agronomic crops, Technology and Application, Kluwer Academic Publishers.
- Rout G.R., Das P., (1994) Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of three species of bamboo. *Plant Cell Rep.* 13: 683-686.
- Rout, G.R., Mohapatra, A., Jain, S.M. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24(6), pp.531-560.
- Roest S & Bokelmann (1981) Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. *Sci. Hort.* 14:357-366.
- Rout, G.R., Mohapatra, A., Jain, S.M. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24(6), pp.531-560.
- Seckinger, G. R. (1991) Micropropagation of vegetable crop species, Technology and Application, Kluwer Academic Publisher, 265 – 284.
- Schutze, R and G. Wiczorrek. (1987) Investigations into tomato tissue cultures. I. Shoot regeneration in primary explants of tomato. *Arch Zuchtungsforschung* 17: 3–15.
- Sutter, E. and Langhans, R.W. (1980) *Hort. Sci.* (15): Abst.428.
- Sutter, E. and Langhans, R.W. (1979) Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, (104):493-496.
- Suzana Pavlović¹, Branka Vinterhalter², Nevena Mitić², S. Adžić¹, N. Pavlović¹, M. Zdravković¹, And D. Vinterhalter²- In Vitro Shoot Regeneration From Seedling Explants In Brassica Vegetables: Red Cabbage, Broccoli, Savoy Cabbage and Cauliflower.
- Scocchi, A., Faloci, M., Medina, R., Olmos, S & Mroginski, L. (2004) Plant Recovery of Cryopreserved Apical Meristem-tips of *Melia azedarach* L. using Encapsulation/ Dehydration and Assessment of their Genetic Stability. *Euphytica* 135: 29- 38.
- Stewart, C. (2008) Plant Biotechnology and Genetics: Principle, Techniques and Application. John Wiley & Sons, Inc. Canada. P. No. 115, 116, 126 127, 128.

- Ssarma M. Micropropagation of *Ageratum conyzoides* L.-An Important Medicinal Plant. Mastaneh Mohammadi. *In vitro* organogenesis of *Ageratum sp. houstonianum* (Asteraceae).
- Shi, L.Y., Strabala, T.J., Hagen, G., Guifoyle, T.J. (1994) Transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins show increased tolerance to exogenous auxin and auxin transport inhibitors. *PLANT SCI.* 100: 9-14.
- Спасеноски, М. (2005), Физиологија на развитокот на растенијата со култура на ткиво, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје.
- Stone OM. (1963) Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices. *Ann. Appl. Biol.* 52:199-209.
- Sumanta, N., Haque, I. C., Nishika J. Suprakash R., (2014) Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences* ISSN 2231-606X Vol. 4(9), 63-69, September (2014) Res. J. Chem. Sci
- Thirukkumaran G, Ntui VO, Sher Khan R, Mii M (2009) Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia* hybrid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 99(1): 109-115.
- Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Micropropagation of ornamental species *Brassica oleracea* cv. Kyoto red given and *Ageratum sp. sp.* *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, XV (1/2). pp. 97-105. ISSN 2545-4455.
- Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Micropropagation of ornamental species *Petunia grandiflora* and *Dianthus chinensis* x *barbatus*. *Yearbook, Faculty of Agriculture, Goce Delcev University - Stip*, 14 (2016). 05-29. ISSN 1857-8608.
- Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2017) Influence of different growth regulators on micropropagation of pink *dianthus* (*Dianthus chinensis* x *barbatus*). In: 3rd International Symposium for Agriculture and Food, 18-20 Oct 2017, Ohrid, Republic of Macedonia.

- Velesanova, Ivana and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2018) Micropropagation of ornamental plants: practical application and opportunities in Republic of Macedonia. In: International Meeting Agriscience & Practice (ASP 2018), 10-11 May 2018, Stip, Macedonia.
- Vasil, I & Thrope, T. (1994) Plant Cell and Tissue Culture. First Edition. Springer. Netherlands. P. No. 46.
- Van, A., A.C., Bruinsma, T., Koehorst, H.J.J. and J.J.M. Dons. (1992) Regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*) using leaf explants. *Acta Hort.*, 307: 109-116.
- Waseem K., Khant M., Jaskant Q., Jilani M., Sohail M. (2009) Effect of different auxins on the regeneration capability of Chrysanthemum leaf discs. *International Journal of agriculture and biology*. 11-4: 468-472.
- Yantcheva, A., M.A. Viahova and A. Antanossov. (1998) Direct somatic embryogenesis and plantregeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 18:148-153.
- Yang, M-Z., Jia, S-R., and E-C. Pua (1991) High frequencyregeneration from hypocotyls explants of Brassica carinataA. Br. Plant Cell Tissue Organ Cult. 24, 79-82.

КОРИСТЕНИ ВЕБ-СТРАНИЦИ

Петунија, (<https://nekretninebl.com/cvijece-koje-cvjeta-cijelo-ljeto-petunija/>), преземено 29.9.2018.

Создавање на ново растение во услови *in vitro*, (http://agritech.tnau.ac.in/bio-tech/biotech_tc_notes.html), преземено на 24.8.2018.